

UNIVERSIDADE TIRADENTES
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA**

RODRIGO LIMA CAVENDISH

ARACAJU
Março– 2014

UNIVERSIDADE TIRADENTES

PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM SAÚDE E
AMBIENTE

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO
HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA**

Dissertação de Mestrado submetida à
banca examinadora, como pré-requisito
para obtenção do título de Mestre em
Saúde e Ambiente na área de
concentração Saúde e Ambiente.

RODRIGO LIMA CAVENDISH

Orientadoras

**Professora Doutora Margarete Zanardo Gomes
Professora Doutora Juliana Cordeiro Cardoso**

ARACAJU
Março – 2014

Dedicatória

Dedico esse trabalho, esse projeto e toda a minha vida ao senhor meu **Deus**, que sempre esteve ao meu lado impedindo que eu desistisse, sempre me colocando no lugar certo na hora certa e com as pessoas certas.

Mas esse mestrado é dedicado especialmente e diretamente ao meu eterno amigo, parceiro e cunhado **Marcos** (*in memoriam*), o cara que me ensinou o viver, a nunca baixar a cabeça, sempre procurando dar a volta por cima e, o principal, sempre com um sorriso no rosto independente do tamanho do problema. **Marcão** você faz muita parte dessa conquista!

A minha esposa **Mariana**, que tem me aguentado em alguns momentos triste e sem esperanças, mas sempre me jogou pra cima, que dormiu diversas vezes sozinha na cama enquanto eu estudava na sala. Essa vitória é nossa, amor!

Aos meus pais, **Waldner** e **Amélia**, que por inúmeras vezes abriram mãos dos seus sonhos para que eu pudesse realizar os meus. Os ensinamentos e os conselhos, levarei sempre comigo. Essa vitória é nossa!

Aos meus irmãos, **Raphael** e **Juliana**, a minha cunhada, **Juliana**, aos meus sobrinhos, **Raphinha** e **Pedrinho**, sem vocês, sem a garra de vocês, a força de vontade, o sonho e a confiança que temos um no outro, eu não teria conseguido. Essa vitória é nossa!

As minhas orientadoras, **Margarete** e **Juliana**, que acreditaram em mim e por mais difícil que tenha sido não desistiram. Ao professor **Ricardo**, só ele sabe o quanto ele me defendeu e me ajudou a chegar até aqui, obrigado pelos exemplos. A minha querida amiga IC, **Ailma**, que sem ela eu não teria conseguido ter terminado meu mestrado, sempre de bom humor e me ajudando muito. Essa vitória é nossa!

E aos meus **amigos**, que na verdade são irmãos, que nunca me deixaram sozinho, sempre me ajudaram a dar a volta por cima, sempre com a mão estendida para me ajudar. Essa vitória é nossa!

"Ninguém baterá tão forte quanto à vida. Porém, não se trata de quão forte pode bater, se trata de quão forte pode ser atingido e continuar seguindo em frente. É assim que a vitória é conquistada.

E quando as coisas vão mal, você procura alguém para culpar, como se fosse uma sombra. O mundo não é um arco-íris e um amanhecer. E não importa o tão durão você seja, apanhará e ficará de joelhos, se assim permitir. Nem você, nem ninguém baterá tão forte quanto a vida. Não importa o quão forte você golpeia, mas sim, quantos golpes você agüenta levar e continuar em frente, o muito que você possa aceitar e seguir adiante. Assim é a vida!."

Agradecimentos

Ao meu **Deus**, que me deu a oportunidade de realizar um dos meus sonhos, que sempre me protegeu e me ensinou muitas coisas durante toda a minha vida. Muito obrigado meu senhor, por sempre ter iluminado meus passos e ter me feito sempre o mais feliz possível.

A minha esposa **Mariana** e a nossa **Mel**. Mari sempre me estimulando, do seu jeito, nunca deixando que eu pense em desistir, confiando e me amando, me deixando sempre muito estabilizado para poder focar, obrigado minha linda. Te amo muito! E Mel é a alegria da casa sempre balançando o rabo e sempre pronta pra brincar, nossa alegria.

Obrigado meus pais, **Waldner** e **Amélia**, por terem apostado no meu sonho, por terem acreditado e sempre me apoiado, mesmo quando eu não merecia. Esse sonho nós sonhamos juntos e alcançamos juntos, muito obrigado pela educação e pela base que vocês me deram. Minha avó **Maria** que sem ela nada teria começado, e a Branca por suas orações.

Raphael, meu irmão, e **Juliana**, minha cunhada, tiveram o nome superação e força de vontade como sobrenome. São o melhor exemplo de um casal que se ama e se ajuda a vencer, obrigado pela força e pela mensagem que vocês me transmitem. **Raphinha e Pedrinho**, sobrinhos lindos que com simples gestos são capazes de mudar o humor de todos, vieram ao mundo para nos encher de alegria e amor.

Juliana, minha irmã querida, obrigado por ser forte, por ser a base que me ajuda bastante e por ser tão minha amiga. Eu te amo, estamos juntos sempre! **Marcos** (*in memorian*) meu cunhado, amigo, muito obrigado por cuidar de mim e da minha família, eu sei que onde você estiver esta sempre olhando e relando por nós. Obrigado pelos ensinamentos de vida.

A minha orientadora **Margarete**, que me recebeu como uma mãe em seu laboratório, sempre me apoiou e me estimulou a não desistir do meu sonho, cuidou de mim e me defendeu, mesmo eu a desorientando tantas vezes, obrigado professora. A **Juliana** minha orientadora também, do seu jeito mais serio me ajudou muito com conselhos e dicas que vou carregar pra sempre. Ao professor **Ricardo** que me ajudou a chegar até aqui e do seu jeitão me recebeu super bem em seu laboratório, obrigado a todos.

Ailma, que me ajudou muito tanto perdendo seus dias de descanso quanto conversando besteira para distrair nos intervalos dos experimentos. E **Jandson** que me abriu as portas para me ensinar a fazer os experimentos e em

momento nenhum me deixou sem sua ajuda. Sem vocês eu não teria conseguido.

Devo muito a **Anna Myrna** que fez que eu junto com meu amigo **Jarly** entrássemos na área de pesquisa e nos ajudou muito, obrigado ao dois. A **Reinaldo, Rafael, Talita, Roberta, Patrícia e toda minha turma do mestrado** que junto com o pessoal do **ITP** me ajudaram muito a aprender coisas novas e importantes.

A Família REAB, principalmente **Paulo e Carol** que confiaram em mim e me deram uma oportunidade e sempre estiveram ao meu lado me ajudando o máximo possível para que eu pudesse melhorar sempre.

A todos os meus amigos que fazem partes dos grupos **Confraria, Jangamaica, Doutores de plantão**, e aos que não fazem destes grupos, obrigado por todo o carinho e amor que vocês dedicaram a mim. A minha família junto com a família da minha esposa, que sempre nos apoiaram e nos ajudaram em tudo que nós tentarmos.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	ix
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES	xi
RESUMO	xiii
ABSTRACT	xiv
INTRODUÇÃO	1
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
1.1. Dor	4
1.2. Nocicepção	5
1.3. Estudo da Dor e da Nocicepção.....	7
1.4. Tratamento para dor	10
1.5. Produtos Naturais	12
1.6. Própolis.....	13
1.7. Própolis Vermelha.....	15
OBJETIVOS	19
2. METODOLOGIA	20
2.1. Obtenção e Caracterização dos Extratos	21
2.2. Animais	22
2.3. Avaliação da Atividade Nociceptiva.....	22
2.3.1. Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	22
2.3.2. Teste da Formalina.....	23
2.4. Teste de Nocicepção Induzida por Glutamato.....	23
2.5. Avaliação da Atividade Motora	23
2.6. Análise Estatística.....	23
3. RESULTADOS	24
3.1. Contorções Abdominais	25
3.2. Teste da Formalina	25
3.3. Teste do Glutamato.....	26
4. DISCUSSÃO	29
5. CONCLUSÃO	33
6. REFERÊNCIAS	35
ARTIGO: ANTINOCICEPTIVE AND GASTROPROTECTIVE EFFECTS OF BRAZILIAN RED PROPOLIS	1
ANEXOS.....	1

Anexo I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA

Anexo II – SUBMISSÃO DO ARTIGO CIENTÍFICO

LISTA DE FIGURAS

1. **Figura 1** – Demonstra as vias aferentes através das quais o estímulo nocivo até chega ao cérebro. Em (a) aplicação do estímulo nocivo; (b) fibras aferentes que primárias; (c) Processamento da informação no corno dorsal da medula espinal; (d) local onde a informação é processada para que a resposta seja emitida e encaminhada pelas fibras eferentes..... 7
2. **Figura 2** – Efeito do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,6%. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni (n = 6/grupo). AAS: ácido acetilsalicílico. 25
3. **Figura 3** – Efeitos do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%, 20 μ L) na primeira (neurogênica) e segunda fase (inflamatória) do teste. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M do tempo gasto lambendo ou mordendo a pata (reação). *** $p < 0.001$ em relação ao grupo veículo, ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni (n = 6/grupo). AAS: ácido acetilsalicílico..... 26
4. **Figura 4.** Efeito do extrato hidroetanólico da própolis vermelha e da formononetina sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo. ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni (n = 6/grupo)..... 27

LISTA DE TABELAS

1. **Tabela 1** – Composição Química da Própolis Vermelha 17
2. **Tabela 2** – Resultados do teste de campo aberto 28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

% – Percentual

AINE – Anti-Inflamatório Não Esteroide

AAS – Ácido Acetilsalicílico

ATP – Adenosina Trifosfato

ANOVA – Análise de Variância

BCP – Própolis Cubana Marrom

BK - Bradicinina

CGRP – Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CONCEA – Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal

CM – Centímetro

COX – Ciclo-Oxigenase

COX2 – Ciclo-Oxigenase 2

EHPV – Extrato Hidroetanólico da Própolis Vermelha

EPM – Erro Padrão da Média

GI – Indicação Geográfica

IL – Interleucina

INPI – Índice Nacional da Propriedade Industrial

IP – Intra Peritoneal

ITP – Instituto de Tecnologia e Pesquisa

KG = Quilograma

MG – Miligrama

MIN - Minutos

ML – Mililitro

MMP – Metaloproteinase da Matriz

NMDA – N-metil-Daspartato

NFG – Fator do Crescimento Neural

OMS – Organização Mundial de Saúde

PGE2 – Prostaglandina E2

PG – Prostaglandina

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

RCP – Própolis Cubana Vermelha

SIED - Sociedade Internacional para o Estudo da Dor

SUS – Sistema Único de Saúde

NO – Óxido Nitríco

PG – Prostaglandin

SNC – Sistema Nervoso Central

SP – Substância P

TNF α – Fator de Necroso Tumoral Alfa

TRPA1 – Receptor de Potencial Transitório A1

TRP – Receptores de Potencial Transitório

UNIT – Universidade Tiradentes

YCP – Própolis Cubana Amarela

ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PRÓPOLIS VERMELHA

RODRIGO LIMA CAVENDISH

RESUMO

A própolis vermelha é um produto natural apícola característico da região Nordeste do Brasil, que possui atividades biológicas descritas, tais como antioxidante e antimicrobiana. Popularmente, é utilizada para tratamento de estados inflamatórios e infecciosos, que frequentemente estão associados à dor. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV). Para tanto, camundongos Swiss adultos machos ($n = 6/\text{grupo}$) foram pré-tratados com EHPV nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg (v.o.) e depois de 60 minutos foram submetidos aos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,6%, 0,1 mL/10 g. i.p.) e de nocicepção induzida por formalina 2%; 20 μL /pata traseira direita ou glutamato (20 μmol /pata), além do teste de campo aberto para avaliação da atividade espontânea. Como controle negativo foi administrado veículo (Tween 80, 0,2% em salina 0,9%) e como controles positivos foram utilizados o ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/Kg, v.o.) ou a morfina (3 mg/kg; i.p.) e o haloperidol (0,2 mg/Kg, i.p.). Os resultados foram analisados por meio de análise de variância de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. Também foi realizada análise química para caracterização do EHPV por cromatografia líquida de alta eficiência. O EHPV promoveu redução no número médio de contorções abdominais, de maneira dose dependente em relação ao veículo, da ordem de 46,6, 73,7 e 88,9% (3, 10 e 30 mg/Kg), enquanto o grupo tratado com o AAS apresentou uma redução de 83,7%. A aplicação de formalina induziu comportamento nociceptivo na primeira (neurogênica) e segunda (inflamatória) fase do teste ($72 \pm 3,8$ e $95,4 \pm 8,2$ segundos, respectivamente, $p < 0,001$). O tratamento com EHPV a 30 mg/Kg produziu redução significativa na fase neurogênica (61%) e todas as doses testadas reduziram a fase inflamatória (77,2, 75,8 e 83,7%, $p < 0,001$). A morfina também causou inibição significativa de 62,1 e 91,4% na primeira e segunda fase e o AAS causou inibição de 35,8 e 82%, respectivamente. O tratamento oral com EHPV 30 mg/kg atenuou a nocicepção induzida por glutamato (74,1%). Resultado semelhante foi observado para a morfina (75,9%, $p < 0,001$). Nenhuma dose de EHPV alterou a atividade dos animais no teste de campo aberto, descartando um possível efeito depressor. Em conclusão, os resultados indicam que o EHPV apresente efetiva ação antinociceptiva central e periférica.

Palavras chave: própolis vermelha, dor, formononetina, formalina, anti-inflamatório.

ANTINOCICEPTIVE EFFECTS OF HIDROALCHOOLIC EXTRACT OF BRAZILIAN PROPOLIS

RODRIGO LIMA CAVENDISH

ABSTRACT

Propolis is a natural bee product and the red propolis is founded in the Northeast of Brazil. It presents many biological activities such as antioxidant and antimicrobial and is commonly used in folk medicine for the treatment of inflammatory and infectious conditions that are often associated with pain. The aim of this work was to evaluate the antinociceptive activity of the hydroethanolic extract of red propolis (HERP). For this purpose, adult male Swiss mice were pretreated with HERP at doses of 3, 10 and 30 mg / kg (p.o.) and 60 minutes later were subjected to the acetic acid-induced abdominal constriction test (0.6 %, 0.1 mL/10 g, i.p.); the formalin-induced paw licking test (2 %, 20 μ L/right hind paw) or to the glutamate-induced nociception (20 mmol/paw). The open field was performed to evaluate the motor and emotional states. Controls groups received vehicle (Tween 80, 0.2% in 0.9% saline) and positive control groups received acetylsalicylic acid (ASA 300 mg/kg, p.o.), morphine (3 mg/kg, i.p.) or haloperidol (0.2 mg/kg, i.p.). Statistical analysis was performed by using the one way analysis of variance followed by Bonferroni post-test. Also, a high performance liquid chromatography was performed in order to chemically characterize the HERP. The writhes evoked by injection of acetic acid were markedly reduced, in a dose-related manner, by the pre-treatment with HERP at 3, 10, and 30 mg/kg (46.6, 73.7, and 88.9%, respectively). ASA (300 mg/kg) also significantly inhibited (83.7%, $p < 0.001$) the writhes induced by acetic acid. The intraplantar injection of the formalin solution produced nociceptive behavior in both the first and second phases (72.0 ± 3.8 and 95.4 ± 8.2 s, respectively). The HERP produced marked inhibition of formalin-induced neurogenic (61.0% at 30 mg/kg) and inflammatory (77.2, 78.5, and 83.7% at 3, 10, and 30 mg/kg, respectively) phases. Similarly, morphine caused significant inhibition of 62.1 and 91.4% of formalin-induced nociceptive behavior in the first and second phases. ASA caused inhibition of 35.8% and 82.0%, respectively, in the first and second phase of formalin-induced nociception ($p < 0.001$). The HERP, given orally, produced marked attenuation of the glutamate-induced nociception at 30 mg/kg (74.1%). Morphine also inhibited (75.9%) the nociception induced by glutamate. The treatment with the HERP failed to significantly change all parameters evaluated on the motor and emotional states, compared with the vehicle group. On the other hand, haloperidol decreased crossing, rearing, and grooming ($p < 0.05$). In conclusion the results indicate that HERP effectively reduces both central and peripheral nociceptive response.

Key words: red propolis, pain, formononetin, glutamate, anti-inflammatory.

INTRODUÇÃO

A Sociedade Internacional para o Estudo da Dor (SIED) define nocicepção como o conjunto de processos neurais envolvidos na codificação e transmissão da informação deflagrada por um estímulo nocivo, enquanto a dor é considerada uma experiência sensorial e emocional associada a dano tecidual potencial ou real.

Dessa forma, a dor e a nocicepção tem um importante papel fisiológico na medida em que representam um sistema de resposta que permite ao organismo reagir, adapta-se e mesmo aprender a esquivar-se de prejuízos à homeostasia. Por outro lado, estados dolorosos crônicos ou sintomáticos, como ocorre durante o processo inflamatório, causam desconforto e requerem tratamento.

Os fármacos frequentemente empregados para tratamento da dor apresentam expressivos efeitos adversos. De acordo com a origem e características específicas da dor, podem ser empregados anti-inflamatórios não esteroidais, opióides, antidepressivos ou relaxantes musculares, que induzem complicações como lesões gástricas, dependência, tolerância e sedação, respectivamente, além de apresentarem eficácia limitada.

Fazem-se necessário, portanto, buscar novas estratégias terapêuticas visando o tratamento da dor e a redução dos efeitos colaterais. Os estudos pré-clínicos que utilizam testes de nocicepção frente a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, bem como modelos de dor de origem inflamatória e neuropática em roedores são fundamentais para a avaliação e o desenvolvimento de novos potenciais fármacos.

A própolis é um produto natural apícola amplamente utilizado pela população para o tratamento de processos inflamatórios e infecciosos, que por sua vez estão frequentemente associados à dor. Estudos anteriores demonstraram que extratos de própolis possuem diversas atividades biológicas, que estão intimamente relacionadas à sua composição química e origem botânica.

A própolis vermelha brasileira representa uma nova variedade de própolis que apresenta composição química distinta de amostras anteriormente estudadas. Na região Nordeste do Brasil, sua origem botânica foi descrita como a *Dalbergia ecastophyllum* e os extratos obtidos, bem como os compostos químicos identificados, apresentaram atividades antioxidante, antimicrobiana, cicatrizante, quimiopreventiva e citotóxica contra células tumorais. A formononetina é um dos compostos químicos encontrados em grande quantidade na própolis vermelha brasileira. Esta isoflavona tem efeitos neuroprotetor, estrogênico e anticancerígeno reportados.

Tanto a própolis vermelha como a formononetina apresentam ainda ação anti-inflamatória. Assim, torna-se interessante avaliar a atividade antinociceptiva destes compostos e seus possíveis efeitos sobre o sistema gastrointestinal, visando à identificação de uma nova estratégia terapêutica para tratamento da dor e inflamação.

O objetivo do presente trabalho, portanto, foi avaliar a atividade antinociceptiva do extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) e da formononetina frente a estímulos químicos em camundongos. Os resultados obtidos são apresentados na primeira parte da dissertação e compõem o corpo de dados que produziu artigo científico anexo, onde é apresentado também o efeito gastroprotetor do EHPV.

1. REVISÃO DA LITERATURA

1.1. Dor

A dor é definida como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial" (LOESER & TREEDE, 2008). É um sintoma comum a diversas doenças, frequentemente associado à busca por atendimento médico e que pode afetar pessoas de qualquer idade, gênero ou etnia (CERVERO & LAIRD, 2008).

Na prática clínica, a dor pode apresentar-se na forma aguda ou crônica (CERVERO & LAIRD, 2008). A origem da dor aguda envolve processos inflamatórios ou infecciosos resultantes, por exemplo, de traumas, queimaduras ou fase pós-operatória (PEREIRA & SOUZA, 2007; CALIL & PIMENTA, 2008; SALLUM et al., 2012). Uma lesão ou dano tecidual leva à liberação de substâncias alogênicas no local da lesão, estimulando terminações nervosas. Sua evolução natural é o cessamento após um curto espaço de tempo, porém se a ativação de vias neuronais for mantida durante um longo período de tempo, o caráter de dor pode mudar para crônico (PASERO & MCCAFFERY, 2001; TEIXEIRA et al., 2003; SANTOS et al., 2007; SALLUM et al., 2012). Devido à plasticidade neuronal, a sensibilização central prolongada (hiperexcitabilidade neuronal) pode resultar em alterações em longo prazo, que podem ser importantes na transição de dor aguda a crônica e o aparecimento de síndromes de dor crônica. Os pacientes com essas síndromes em geral tem dor intensa e persistente que é desproporcional à lesão tecidual (FRANCO et al., 2011).

Embora a dor aguda possua um papel protetor como um sistema de alerta (SOMERS & CLEMENTE, 2009), pode causar efeitos como taquicardia, arritmias, diminuição do fornecimento de oxigênio aos tecidos, agitação, sudorese, aumento do débito cardíaco, aumento da pressão arterial, risco de sangramento, aumento do tônus muscular, bem como sensações de medo e ansiedade. Consequentemente pode ocorrer diminuição do sono, perda ou diminuição do apetite, desidratação, dificuldade em caminhar, dificuldade de se levantar da cama, dificuldade para respirar profundamente em função da diminuição da expansibilidade do tórax, tosse, aumento no tempo de internação de pacientes (SANTOS et al., 2007; BOTTEGA & FONTANA, 2010; SALLUM et al., 2012).

A dor crônica, por outro lado, é geralmente de longa duração, sendo o período de permanência igual ou superior a três meses (OLIVEIRA, 2000; SALLUM et al., 2012). Apresenta recorrência ou um padrão de persistência contínuo e tem intensidade de moderada à grave (CHRUBASIK et al., 1998; GUREJE et al., 1998; CATALA et al., 2002; RUSTOEN et al., 2004; BREIVIK et al., 2005; YU et al., 2006; AZEVEDO et al., 2012). Ao contrário da dor aguda, a dor crônica persiste após a

cicatrização do ferimento e pode estar relacionada a processos patológicos crônicos (OAKLANDER et al., 2006), ou ainda à lesão do sistema nervoso periférico (SOMERS; CLEMENTE, 2009; MELNIKOVA, 2010).

A OMS estima que 20% dos indivíduos em todo o mundo têm algum grau de dor crônica (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; Azevedo et al., 2012), com consequente prejuízo da qualidade de vida para as pessoas afetadas (DENNIS et al., 2011).

Para a avaliação da dor aguda destacam-se a intensidade da dor, alterações neurovegetativas e acompanhamento do tratamento farmacológico, enquanto a avaliação da dor crônica demanda o uso de instrumentos multidimensionais, como componentes comportamentais (atitudes), além de aspectos emocionais, sociais, cognitivos, crenças, expectativas e valores individuais (SALVETTI & PIMENTA, 2005; SALLUM et al., 2012).

Para que os tipos e as causas da dor possam ser melhor compreendidos, é necessário que ocorra um detalhamento dos mecanismos fisiológicos. Para tanto, são utilizados modelos de nocicepção, que consitui o conjunto de eventos para detecção e transmissão da dor dentro do organismo.

1.2. Nocicepção

A nocicepção é o processo pelo qual os estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados, transmitidos e codificados pelo sistema nervoso. Os receptores sensoriais específicos para a dor, ou nociceptores, são as terminações nervosas livres e estão distribuídos na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (JULIUS, 2001; PARADA et al., 2002; BASBAUM et al., 2009).

Os nociceptores não sinalizam somente a dor aguda, mas também contribuem em condições dolorosas persistentes de cunho patológico. Moléculas de transdução da nocicepção foram identificadas e o maior grupo de detectores de estímulos nocivos é a família dos receptores de potencial transitório (TRP) (CHENG; JI, 2008; PATAPOUTIAN et al., 2009). Hernández-Ortega et. al, (2012) reportaram que os radicais livres, que aumentam a toxicidade, também desempenham um papel importante na dor. Quando ativados, os nociceptores dão início à transmissão da informação que será enviada, através das fibras nervosas aferentes, para o SNC, onde será identificada a intensidade, qualidade, localização e duração do estímulo nocivo (SESSLE, 2000; FRANCO et al., 2004).

As fibras sensoriais aferentes são classificadas segundo o seu diâmetro e grau de mielinização. Quanto maior for o diâmetro axonal e maior a quantidade de mielina,

maior será a velocidade de condução (FRANCO et al., 2004). Em relação à transmissão dolorosa, classificaram as fibras nociceptivas em três diferentes tipos principais 1) Fibras A delta ($A\delta$) que são mecanotérmicas, e respondem a estímulos térmicos e mecânicos intensos; 2) Fibras C não mielinizadas, que são mais sensíveis a estímulos mecânicos, térmicos e químicos intensos; 3) Fibras A beta ($A\beta$) mecanorreceptivas de alto limiar de excitabilidade, que respondem de uma melhor forma aos estímulos mecânicos intensos. (DUBNER & BENNETT, 1983; JULIUS & BASBAUM, 2001; WOOLF & MA, 2007). Além disso, as fibras C não mielinizadas apresentam pequeno diâmetro e uma condução mais lenta; as fibras mielinizadas do tipo $A\delta$ tem diâmetro médio e velocidade moderada; e as fibras $A\beta$ apresentam um diâmetro maior e velocidade de condução é mais rápida (JULIUS & BASBAUM, 2001; WOOLF & MA, 2007; BASBAUM et al., 2009).

As fibras $A\delta$ e C transportam a informação neural ao gânglio da raiz dorsal na medula espinal ou ao gânglio trigeminal no tronco encefálico, onde os corpos celulares dos aferentes primários estão localizados. No tronco encefálico ocorre a primeira retransmissão sináptica da informação (FRICTON & DUBNER, 2003). Os neurônios sensoriais ganglionares ocuparam uma posição importante nas vias ascendentes nociceptivas, pois representam o primeiro local no sistema nervoso onde são processadas as sensações. Existem evidências de que essas células ganglionares contribuem para o estabelecimento da dor crônica (BINSHTOK et al., 2008).

Sinais nociceptivos dentro do encéfalo são enviados para duas grandes áreas: o córtex somato sensorial, onde o componente sensorial da dor é representado no cérebro, e o sistema límbico, que é o substrato neural para o componente emocional da experiência de dor responsável pela sensação de sofrimento (SYDNEY & CONTI, 2011). Muitos estados de dor neuropática têm sido tradicionalmente considerados como tendo uma etiologia primária periférica (traumas em fibras). Entretanto, técnicas de neuroimagem funcionais mostraram que muitas condições neuropáticas e outras dores crônicas podem ter um componente central (KLAUMANN et al., 2008).

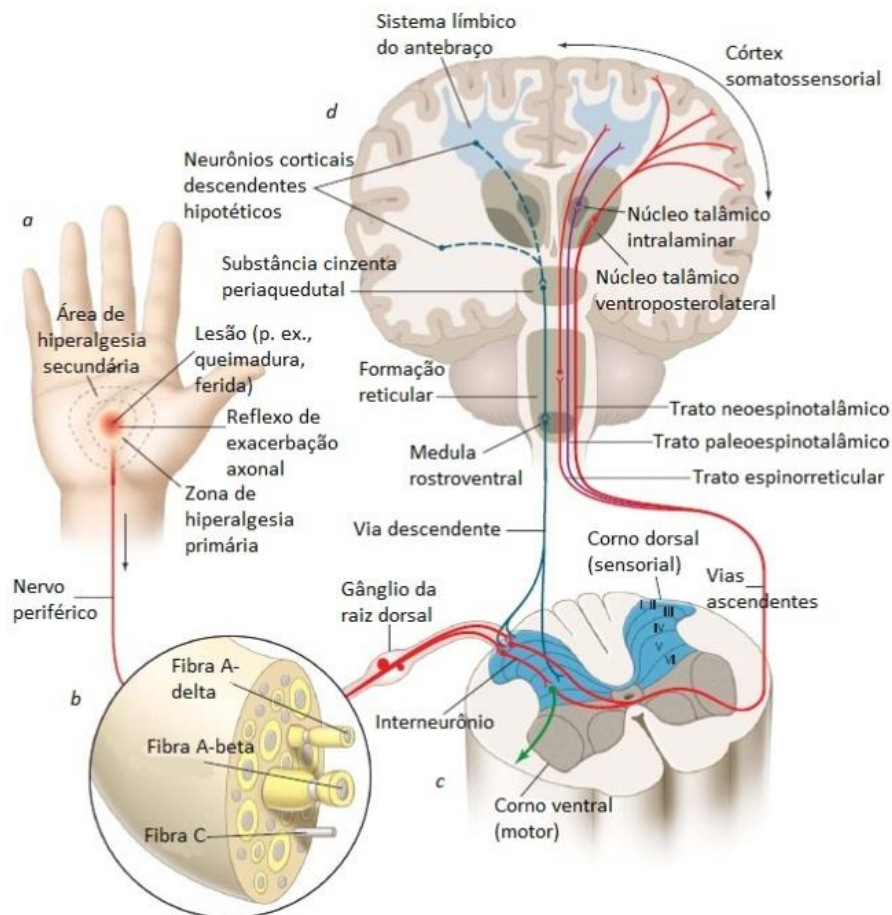


Figura 1 – Demonstra as vias aferentes através das quais o estímulo nocivo até chega ao cérebro. Em (a) aplicação do estímulo nocivo; (b) fibras aferentes que primárias; (c) Processamento da informação no corno dorsal da medula espinal; (d) local onde a informação é processada para que a resposta seja emitida e encaminhada pelas fibras eferentes. (OAKLANDER ; 2011)

1.3. Estudo da dor e da nocicepção

De acordo com o mecanismo subjacente à sua origem, a dor pode ser considerada nociceptiva, dor neuropática e dor crônica (geralmente associada à inflamação) ou de percepção anormal, tal como a hiperalgesia (alodinia)(CERVERÓ & LAIRD, 2008; CARROLL. et al., 2010).

A dor nociceptiva é resultante da transdução de sinal realizada em terminais aferentes somatossensoriais que convertem a energia mecânica, elétrica, térmica ou química em um potencial de ação, que é transmitido para o corno dorsal da medula espinal por fibras nervosas especializadas (KLAUMANN et al., 2008).

A dor neuropática é "a dor iniciada ou causada por uma lesão primária ou disfunção do sistema nervoso" (TURK & OKIFUJI 2002). A resposta apresenta-se

alterada em pacientes com dor neuropática, pois ocorre um estado de hiperexcitabilidade e emissão de sinal de dor contínuo, mesmo na ausência no tecido periférico (MACKEY & MAEDA 2004). Pode ser resultante de lesão ou trauma (por exemplo, cirurgia), infecção (por exemplo, pós-herpética neuralgia), ter origem endócrina (por exemplo, diabetes), desmielinização (por exemplo, esclerose múltipla), resultar de falhas no metabolismo, de doenças neurodegenerativas (por exemplo, doença de Parkinson), ou de danos à medula espinhal ou encéfalo (por exemplo, acidente vascular cerebral (MACKEY & MAEDA 2004). A dor neuropática é caracterizada pela presença de latência e entorpecimento, sensações que são distintas de dor nociceptiva em queimação (YOUNGER et al., 2011).

Já dor que está presente durante a inflamação, ocorre quando as células e tecidos são danificados e liberam de mediadores químicos (inflamatórios) que sensibilizam nociceptores (MENDES, 2012). A sensibilização periférica ocorre quando mediadores inflamatórios causam uma redução no limiar necessário para a deflagração do potencial de ação após ativação do receptor. Pode ocorrer também uma sensibilização central de curto prazo, em que há um aumento da excitabilidade neuronal e da resposta no corno dorsal da medula espinal. Na sensibilização central, mediadores inflamatórios também podem modificar a expressão de genes que alteram a transmissão sináptica, podendo ocorrer alterações plásticas periféricas e centrais (PATAPOUTIAN et al., 2009).

Entre os mediadores inflamatórios pode-se citar o ácido láctico, a bradicinina (BK), as prostaglandinas (PG), a substância P (SP), íons potássio, serotonina, histamina, fator de crescimento neural (NGF), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), íons hidrogênio, ATP, citocinas e óxido nítrico (NO) (FRICTON & DUBNER, 2003; FRANCO et al., 2004).

As citocinas pró-inflamatórias como o fator de necrose tumoral alfa (TNF α), a interleucina (IL) 1 e IL6 apresentam grande importância na hiperexcitabilidade neuronal (NASCIMENTO et al., 2013). Há evidências que de estas citocinas promovam aumento da síntese e liberação da metaloproteinase da matriz (MMP) 9, que esta estreitamente relacionada com a liberação de neutrófilos (KAWASAKI et al., 2008; KHANDOGA et al., 2006; SPEARS et al., 2005) e com a manutenção de plasticidade sináptica no tecido neural (CANDELARIO-JALIL et al. 2009). Já a MMP 2 está envolvida com o desenvolvimento e regeneração dos tecidos (YONG, 2005). Esta família de proteínas é produzida por células ganglionares em resposta a vários estímulos, tais como a um processo inflamatório, e podem ser transportados a partir do corpo celular para a periferia, (JI et al., 2009).

Para uma melhor elucidação dos mecanismos fisiopatológicos da dor visando o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, são utilizados modelos animais de nocicepção periférica e visceral, ou inflamatória (FILLINGIM et. al., 2009; DANIELSKI, 2010). Fillingim et al. (2009) propuseram modelos animais para compreender a biologia fundamental da iniciação, continuação e subsequente cessação do sinal doloroso. Os ensaios em animais utilizam estímulos elétricos, térmicos, mecânicos e químicos e foram desenvolvidos para estudo da dor nociceptiva e inflamatória (MELNIKOVA, 2010). Entre os modelos descritos por Fillingim et. al. (2009) pode-se citar o teste da formalina, as contorções abdominais induzidas por ácido acético e teste da nocicepção induzida por glutamato.

O teste da formalina é descrito como um teste nociceptivo de resposta a estímulo químico, no qual é aplicada uma injeção de formalina na pata do animal. A formalina age no receptor de potencial transiente anquirina 1 e produz uma resposta passível de quantificação, onde o animal lambe, bate ou morde a pata (MACPHERSON et al., 2007; MACNAMARA et al., 2007). O teste consiste de duas fases, sendo que a primeira ocorre durante os primeiros minutos após a injeção e é relacionada à estimulação direta do nociceptores. Após um período de latência de aproximadamente vinte minutos, é iniciada uma segunda fase (FARMER & AZIZ, 2013), que envolve mecanismos inflamatórios e sensibilização central no corno dorsal da medula espinal (AGOSTINI et al., 2009). A primeira fase pode ser inibida por anestésicos locais, a segunda fase mostra resposta frente a várias drogas como anti-inflamatórios estereoides ou não estereoidais, opióides e antagonistas de receptores para glutamato.

No teste de contorções abdominais, o ácido acético, aplicado intraperitonealmente, atua como um fator irritante que produz o comportamento estereotipado mensurável (LE BARS et al., 2001). A administração de ácido acético causa aumento da atividade da fosfolipase da membrana e resposta inflamatória mediada por citocinas, eicosanóides, leucotrienos e prostaglandinas. Dessa forma, inibidores da ação das prostaglandinas, por exemplo, diminuem as contorções (CHOI & HWANG, 2004).

O glutamato é o principal neurotransmissor do sistema nervoso central e está também envolvido na nocicepção periférica. Sua atuação pode se dar tanto na iniciação da resposta nociceptiva (LEE et al., 2007; ZHANG et al., 2009), através de receptores TRPA1 (KLAFKE et al., 2012), como também na manutenção na transmissão espinal e supraespinal (FUNDYTUS et al., 2001). Por exemplo, concentrações elevadas de glutamato em pele e músculos estão associadas com a

dor (TAMBELI et al., 2003); neurônios do gânglio da raiz dorsal contêm receptores de glutamato (GOUDET et al., 2009; LARSSON, 2009); e a infusão epidural de glutamato pode criar hiperalgesia focal (JANE et al., 2009). A resposta mediada por receptores para glutamato, ionotrópicos e metabotrópicos, envolve a síntese de óxido nítrico (NO) (BEIRITH et al., 2002). Neste sentido, espécies reativas de oxigênio têm sido implicadas na resposta nociceptiva e inflamatórias (HEINE et al., 2011).

1.4. Tratamentos para dor

O aumento da variedade de novos fármacos, técnicas cirúrgicas, da eficiência da reabilitação e das opções de tratamento alternativos e complementares favorece o tratamento de pacientes com dores crônicas. Entretanto, mesmo quando tratamentos tem uma boa efetividade para reduzir a dor, muitas vezes produzem efeitos adversos indesejáveis (DENNIS et al., 2011).

O uso de drogas para tratamento a dor cresceu exponencialmente, com aumentos nos gastos da ordem de 188% (GUGGENHEIMER & MOORE, 2011). Dentre as classes farmacológicas utilizadas podem ser destacados os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os ópioides, relaxantes musculares e antidepressivos (OZKAN et al., 2009).

São exemplos de AINEs o ibuprofeno, paracetamol e o ácido acetilsalicílico (AAS). A inibição da atividade das COXs é o principal mecanismo de ação dos AINEs. A enzima COX é importante para a produção de PG, prostaciclina e tromboxanos que sensibilizam nociceptores (GELLER et al., 2012).

O AAS inibe a síntese da COX e interfere com a cascata do ácido araquidônico, bloqueando a síntese do tromboxano, que resulta na inibição da agregação plaquetária. Em altas doses (>325 mg/dia), o AAS pode apresentar um efeito paradoxal, porque ele também inibe a síntese da prostaciclina nas células endoteliais e plaquetas, que pode favorecer a formação de trombos (NATIONAL INSTITUTE FOR HEALTH AND CLINICAL EXCELLENCE, 2008). Os AINEs apresentam efeitos adversos, sendo um dos mais graves a gastropatia (CHAIAMNUAY et al., 2006), além de estarem relacionados com o aumento do risco cardiovascular (ROELOFS et al., 2008).

Os opiáceos apenas são considerados como primeira alternativa do tratamento para a dor em circunstâncias específicas, como durante exacerbação episódica de dor neuropática grave dor ou em indivíduos com dor intensa (KNOTKOVA et al., 2009; DWORKIN et al., 2010; ATTAL et al., 2010), pois possuem efeitos adversos graves

como constipação, náusea, vertigem, dependência, tolerância e analgesia inadequada (VISSERS et al., 2010; CHERNY et al., 2001; KORKMAZSKY et al., 2011).

Entre os opióides mais utilizados estão a morfina, a meperidina, a fentanila, o alfentanil e o sufentanil (SALIGRAM & BIELEFELDT, 2012). Furlan et al. (2006) realizaram uma meta-análise de 41 ensaios randomizados, avaliando o efeito dos opióides para o tratamento de várias formas de dor, incluindo osteoartrite, neuropatia diabética dolorosa, dor lombar e artrite reumatoide, concluindo que, em média, opióides promoveram discreta melhora na intensidade da dor e melhora funcional em comparação com o placebo.

Os relaxantes musculares são recomendados como terapia coadjuvante para o alívio da dor em curto prazo. Em estudos de qualidade, esta classe de fármacos apresentou um efeito superior ao placebo para fibromialgia, bem como no alívio da dor e dos espasmos musculares. A sedação é um efeito colateral comum, que compromete as atividades de vida diária (SEE et al., 2008). Os relaxantes musculares atuam interrompendo a transmissão química na junção neuromuscular, bloqueando a ligação da acetilcolina com receptores musculares, daí serem denominados de bloqueadores neuromusculares. Na medula espinal os relaxantes musculares alteram reflexos poli e monossinápticos, com consequente efeito vasodilatador, aumento do fluxo sanguíneo e inibição o reflexo de retirada (MANCHIKANTI et al., 2010).

Já os antidepressivos têm diversos efeitos que podem contribuir para o seu efeito analgésico, incluindo efeitos sobre receptores onotrópicos de glutamato N-metil-Daspartato (NMDA), de adenosina, serotonina, noradrenalina e sobre os canais de sódio. Tem sido indicado para tratamento da dor neuropática, dor lombar e dores de cabeça (; ATTAL et al. 2006; VERDU et al., 2008)

Os antidepressivos mais utilizados são os denominados tricíclicos, por exemplo, amitriptilina e ciclobenzaprina, mais frequentemente usadas. Eles atuam principalmente bloqueando a recaptação de serotonina e noradrenalina (ARNOLD et al., 2010). Os antidepressivos tricíclicos têm importantes efeitos colaterais, incluindo eventos cardiovasculares como hipertensão, hipotensão postural e arritmias. Além disso, apresentam baixa tolerabilidade, pois doses elevadas podem tornar se tóxicas. Uma revisão sistemática mostrou efeitos positivos de antidepressivos tricíclicos na dor neuropática, dor lombar, dores de cabeça e síndrome do intestino irritável (VERDU et al., 2008).

Apesar dos importantes avanços na compreensão da neurofisiologia da dor e do crescente aumento na disponibilidade de diagnósticos e procedimentos, bem como

a aplicação de modalidades terapêuticas e abordagens mais modernas, atualmente os tratamentos disponíveis para a dor raramente resultam em resolução completa dos sintomas. Além disso, nota-se grande quantidade de efeitos colaterais (DENNIS et al., 2011; SERRANO-AGUILAR et al., 2011).

1.5. Produtos naturais

Plantas, fungos, insetos, organismos marinhos e bactérias são fontes importantes de substâncias biologicamente ativas e muitos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO & BOLZANI, 2009; WELLS, 2011). À medida que mais pesquisas são feitas com produtos naturais, novos compostos são identificados, bem como seus mecanismos de ação, inclusive para o tratamento da dor (CHRISTOPHER & STEPHEN, 2005)

No Brasil observa-se um elevado consumo de produtos naturais. O crescente índice de utilização de plantas medicinais pela população favoreceu a implantação desses produtos pelo Sistema Único de Saúde (SUS), através de políticas públicas na área da saúde, que já conta com 16 Estados em que o produto natural é disponibilizado. A indicação terapêutica de produtos naturais pelos profissionais da medicina deve estar associada à garantia de segurança, eficácia e qualidade no tratamento. Para tanto, o Brasil propôs a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no sistema de saúde pública (OLIVEIRA et al., 2012).

Essas práticas são regidas por normas que adequam a utilização dos produtos naturais à prática medicinal regulamentada (OLIVEIRA et al., 2012). Dessa forma, o uso de produtos naturais pode ser considerado um recurso terapêutico válido que pode incentivar o desenvolvimento comunitário, a integração e a participação social, além do desenvolvimento científico (BRASIL, 2006; BRAZ-FILHO 2010; MALVEZZI 2010).

A apicultura é uma prática realizada por mais de 3.000 anos, sendo considerada uma atividade importante e bem desenvolvida, com propósitos direcionados à criação e o manejo de abelhas, bem como de seus subprodutos, desde a idade do ferro (BLOCH et al., 2010). É uma atividade ecologicamente sustentável que gera renda para os produtores e está aliada a conservação do ambiente, tendo em vista a necessidade de manutenção do pasto apícola para a obtenção destes produtos. A atividade apícola tem como prerrogativa a conservação das espécies

vegetais nativas permitindo a utilização permanente das mesmas pelas abelhas (OLIVEIRA et al., 2010).

A utilização destes recursos naturais apresenta um significativo retorno financeiro e de baixo impacto ambiental, podendo ser desenvolvida por pequenos produtores (SEBRAE, 2003; OLIVEIRA et al., 2010). Desta forma, a apicultura brasileira tem propiciado desenvolvimento econômico, envolvendo principalmente a agricultura familiar (OLIVEIRA et al., 2010).

1.6. Própolis

A própolis é uma mistura resinosa coletada a partir de gemas e exsudatos de plantas por abelhas (MONZOTE et al., 2012). Esta substância é usada como material de isolamento de edifícios em colmeias. Devido à sua ampla utilização na medicina popular, a própolis tem sido objeto de estudo farmacológico e químico intenso. Ganhou popularidade como um suplemento alimentar e é amplamente utilizado em alimentos e bebidas em várias partes do mundo. Estudos demonstraram a sua versatilidade em atividades terapêuticas, incluindo ação antimicrobiana, anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante e hepatoprotetora (LOTFY, 2006).

Em geral, a própolis bruta é composta de 50% de resinas vegetais, 30% de cera de abelha, 10% de óleos essenciais, 5% de pólen e 5% de substâncias orgânicas (MENEZES, 2005; TOITET al., 2009), podendo as concentrações sofrer pequenas modificações dependentes do tipo da amostra (BERRETTA et al., 2012). A coloração da própolis pode variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado (LOTFLY, 2006; INOUE et al., 2007).

A composição química da própolis é complexa e depende da flora local no sítio de recolha. Amostras de própolis de zonas tropicais apresentam composição química variável, que inclui terpenóides, derivados de ácidos orgânicos prenilados, lignanas e flavonóides (BANKOVA et al., 2000; SFORCIN et al., 2000; CUESTA-RUBIO et al., 2007, DURAN et al., 2008, SALOMÃO et al., 2008; CASTRO et al., 2009; MONZOTE et al., 2012). No Brasil, são descritas propriedades biológicas e composições químicas distintas para diferentes amostras coletadas em diferentes partes do país, que foram agrupadas em 13 tipos a partir da caracterização dos perfis físicos, químicos e botânicos. (TRUSHEVA et al., 2006 ;MENDONÇA, 2010).

A própolis de cor castanho claro (tipos 2 e 4) é encontrada no Rio Grande do Sul e Paraná, respectivamente. A que apresenta coloração castanho escuro pertence ao grupo 8, de Pernambuco. A própolis do grupo 3 é proveniente do Paraná. Tem

como origem botânica a resina do botão floral de *Populus alba* e encontram-se éster do ácido dimetil dialil caféico, crisina e galangina em sua composição química. A própolis amarela e amarela escuro caracterizam os grupos 1 do Rio Grande do Sul, 9 de Pernambuco, 10 do Ceará e 11 do Piauí. Já a variedade marrom esverdeado é encontrada no Paraná (grupo 5) e na Bahia (grupo 7) (MENDONÇA, 2010).

A variedade mais estudada e comercializada é a própolis verde ou marrom esverdeada representativa do grupo 12, encontrada principalmente em São Paulo e Minas Gerais. Esta variedade tem sua origem botânica à resina de folhas jovens de *Baccharis dracunculifolia* e apresenta em sua composição química flavonóides, ácidos fenólicos, cetonas, aldeídos aromáticos, alcoóis, terpenos, ácidos graxos, aminoácidos, oligoelementos, vitaminas B1, B2, B6, E, C e hidrocarbonetos. A cor marrom avermelhado (grupo 6) é encontrada na Bahia, possuindo origem botânica atribuída principalmente à resina de folhas jovens de *Hyptis divaricata* (MENEZES, 2005).

Diversos compostos químicos já foram identificados e/ou caracterizados na própolis. As substâncias mais comuns encontradas nas variedades brasileiras são os ácidos fenólicos (ácido gálico) (MARCUCCI et al., 2001; BARBOSA, 2009; BECHER et. al, 2010), os flavonóides (como a quercetina, pinocembrina e formononetina), os derivados do ácido cinâmico, ésteres, terpenos, aldeídos e cetonas, fenilpropanóides (como os ácidos caféico e clorogênico) (LUSTOSA et al., 2008). Também foram identificados elementos inorgânicos como o cobre, manganês, cálcio, alumínio, silício, zinco, cromo (MARCUCCI, 1996) e vitaminas (A, B1, B2, B6, C, E) (MENEZES, 2005). Estas substâncias são consideradas biologicamente ativas (MARCUCCI et al., 2001; BARBOSA, 2009; BECHER et. al, 2010).

Dentre os compostos citados, o grupo dos flavonóides tem sido mais intensamente estudado (LUSTOSA et al., 2008). A ingestão de flavonóides e terpenóides pode interferir em diversos processos fisiológicos, atuando nos mecanismos responsáveis por promover a cicatrização de ferimentos, principalmente devido às suas características adstringente e antimicrobiana (WILLIAMS et al., 2004).

Além disso, os flavonóides apresentam atividades inibidoras do ciclo-oxigenase (COX) e lipooxigenase, de redução de prostaglandina E2 (PGE2) e redução da expressão da isoforma induzida da COX (COX-2) (BERRETTA et al., 2012). Desta forma, podem modular a resposta inflamatória. Os flavonóides apresentam também atividade antioxidante e moduladora do sistema imune (WILLIAMS et al., 2004; ADELMAN, 2005; ALENCAR et al., 2007). Não obstante, a própolis vermelha cubana

avaliada sob a forma de extratos hidroetanólicos, ricos em flavonóides, apresentou atividade anti-inflamatória (LÉDON, 1997), cicatrizante, anestésica e antioxidante (ADELMAN, 2005).

1.7. Própolis vermelha

A própolis de coloração vermelha tem sido encontrada na costa da região nordeste do Brasil (Daugusch, et al., 2008); em Cuba (Piccinelli et al, 2011).; Venezuela (Trusheva et al, 2004.); México (Lotti et al., 2010) e China (Daugusch et al, 2008; Izuta et al., 2009; Silva et al., 2009; Piccinelli et al., 2011; OHGUCHI et al., 2012) e foi classificada como pertencente ao grupo 13.

No Brasil, é encontrada nos estados de Alagoas, Sergipe, Bahia, Paraíba e Pernambuco (MENDONÇA, 2010). Em Cuba, devido à grande diversidade botânica e riqueza da flora, foram identificados três tipos de própolis, com base em suas classes de metabólitos secundários: marrom (BCP), vermelho (RCP) e amarelo (YCP) (CUESTA-RUBIO et al., 2007). Além disso, várias atividades biológicas da própolis cubana foram descritas, tais como antipsóricos, anti-inflamatórias (LEDON et al., 1996) e antitumoral (POPOLO et al., 2009).

Tem sido relatado que esta variedade é típica de Cuba, onde a fonte vegetal foi identificada como nemorosas (*Clusiaceae*) (CUESTA – RUBIO et al., 2002) e Venezuela, onde as abelhas recolhem-no de *Clusia scrobiculata* (TRUSHEVA et al, 2004; PICCINELLI et al., 2011). Nos mangues do litoral nordestino brasileiro, a fonte apícola da própolis vermelha é o exudato do caule da *Dalbergia ecastophyllum*. Importantes constituintes químicos descritos foram os flavonóides (pinocembrina, formononetina, rutina, quercetina, dalbergina entre outros) e ácidos fenólicos (ácido felúrico) (TRUSHEVA et al., 2006; SOUSA, 2007; MENDONÇA, 2010; DAUGSCH et al., 2008, 2013).

Própolis vermelha de Alagoas obteve recentemente a Indicação geográfica (GI) pelo Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI), e é a única própolis vermelha de origem certificada no Brasil (SEBRAE, 2012). López et al. (2014) realizaram um estudo onde separou os tipos as própolis vermelhas do nordeste do Brasil. Agrupou as própolis vermelhas de Alagoas e Paraíba e separou a amostra de Sergipe como pertencente ao grupo B. Foi reportado que a própolis vermelha de Sergipe apresentou formononetina e biochanina A como os componentes principais.

López et al. (2014) caracterizaram amostras de própolis vermelha brasileira que foram divididos em dois grupos de acordo com a predominância de íons

marcadores específicos. No grupo B, os íons marcadores foram os mesmos apresentam na *D. ecastophyllum* (formononetina biochanina A e pinocembrina). Para o Grupo A o íon marcador foi provavelmente uma benzofenona de uma espécie de Guttiferae. Estes resultados indicam que, pelo menos duas espécies de plantas são as principais fontes de resinas para a própolis vermelha brasileira e a sua contribuição depende de cada espécie para a composição da própolis que vai variar regionalmente e provavelmente sazonalmente, resultando em dois tipos diferentes de própolis vermelha brasileira.

Em relação à atividade biológica da própolis vermelha, Franchi et al. (2012) realizaram uma comparação entre a citotoxicidade das variedades verde e vermelha de própolis brasileira em linhagens de células leucêmicas e os resultados mostraram que a própolis vermelha foi mais citotóxica. Os autores sugeriram a possibilidade da utilização de componentes da própolis vermelha no tratamento do câncer.

Siqueira et al. (2009) também compararam a ação de extratos etanólicos de própolis verde e vermelha quanto à sua atividade antifúngica e observaram que o extrato de própolis vermelha foi mais efetivo. Albuquerque-Júnior et al., (2009) demonstraram que a incorporação da própolis vermelha em filmes de colágeno bovino tipo I foi capaz de melhorar a cicatrização de feridas realizadas no dorso de ratos, por modulação dinâmica da evolução do processo de inflamatório e da deposição de colágeno.

Almeida et al. (2013) relataram a incorporação do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha em filme podem fornecer redução de estímulos quimiotáticos, induzida por prostaglandina, e também a eliminação microbiana rápida associada a fagocitose, o que por consequência, pode melhorar o a cicatrização.

A própolis vermelha demonstrou atividade antioxidante e antimicrobiana em estudos in vitro (ALENCAR et al., 2007; IZUTA et al., 2009). Lio et al., (2012) mostraram que extrato etanólico de própolis vermelha brasileira interfere com a homeostase do colesterol podendo ser benéfico na terapia e prevenção da arteriosclerose. Este mesmo grupo (LIU et al., 2010) reportou que o extrato etanólico da própolis vermelha modificava a diferenciação de adipócitos e poderia ser utilizado no tratamento da obesidade. Daleprane et al., (2011 e 2012) realizaram estudos in vivo e in vitro, e demonstraram que polifenóis da própolis vermelha reduzem lesões arterioscleróticas, por meio de ação antiangiogênica e anti-inflamatória.

Muitas ações descritas podem estar relacionadas às características químicas desta substância. A própolis vermelha brasileira possui novos compostos bioativos em

relação às variedades antes estudadas e alguns são exclusivamente encontrados na própolis proveniente de Sergipe. A tabela 1 resume os principais resultados relativos à composição química da própolis vermelha.

Quadro 1. Composição Química da Própolis Vermelha

AUTOR	COMPOSIÇÃO QUÍMICA
MATSUDA et al., 2002; ROCHA et al., 2003; OZKUL et al., 2004; HU et al., 2005; HAYACIBARA et al., 2005	Flavonóides (galangina, quercetina, formononetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides (clorogênico), esteróides, aminoácidos, polissacarídeos, hidrocarbonetos, ácidos graxos.
DAUGSCH et al., 2008; RIGHI, 2011; SUN et al., 2012	Isoflavonóide (formononetina), flavonóides, ácidos aromáticos e ésteres, aldeídos e cetonas, terpenóides e fenilpropanóides.
MARCUCCI, 1996	Cobre, manganês, ferro, cálcio, alumínio, vanádio e silício.
LIMA, 2006; VOLPI & BERGONZINI, 2006	Flavonóides (como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol), ácidos fenólicos.
LÓPEZ et al., 2014	Flavonóidee isoflavonas (chrysin, kaempferol, quercetina, naringenina, pinocembrina, formononetina, biochanina A e daidzeína)

Embora ocorram alterações significativas nas concentrações de componentes fenólicos durante o ano, além de alteração na coloração da amostra (MENDONÇA, et al. 2011), a própolis vermelha apresenta como composto majoritário o isoflavonóide formononetina (RIGHI, 2011; SUN et al., 2012).

A formononetina é encontrada na própolis vermelha (DAUGSCH et al., 2008) e em outras fontes naturais, tais como leguminosas (WANG et al., 2008; DELGADO-ZAMARREÑO et al., 2012) e possui ação anti-inflamatória e antioxidante (DAUGSCH et al., 2008; NEWARIRY et al., 2009). Os mecanismos de ação farmacológica desta molécula têm sido demonstrados em estudos *in vitro* e *in vivo*. Park et al., (2010) encontraram evidências de que esta substância regulou a ação de mediadores proteicos citotóxicos em células neuronais após hipóxia, exercendo ação neuroprotetora. Huh et al. (2011) encontraram indícios de sua ação na regulação de fatores de transcrição que favorecem o processo de cicatrização em ratos e em experimentos *in vitro*.

A formononetina demonstrou também possuir ação antitumoral auxiliando a inibição da proliferação de células prostáticas cancerígenas de origem humana (YE et al., 2012) e células cancerígenas mamárias de ratos (CHEN et al., 2013). Quando administrada isoladamente, ou associada a outros flavonóides, diminuiu o estresse oxidativo em modelo para estudo da doença de Alzheimer (OCCHIUTO ET AL., 2009) e reduziu a morte neuronal in vitro (CHEN et al., 2008; SUN et al., 2012).

Finalmente, cabe salientar que diferentes variedades de própolis têm sido amplamente utilizadas em processos inflamatórios e infecciosos, principalmente em função de sua atividade antimicrobiana e anti-inflamatória. Embora esses processos possam frequentemente ser acompanhados por estados dolorosos, não há estudos visando o estudo da atividade antinociceptiva da própolis vermelha.

OBJETIVOS

GERAL

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva do extrato Hidroetanólico da própolis vermelha utilizando modelos animais.

ESPECÍFICOS

- ✓ Verificar a redução álgica produzida por estímulos nocivos químicos através da:
 - Realização de testes para as vias centrais;
 - Realização de testes para as vias periféricas;
 - Realização de testes para as vias neurogênicas.
- ✓ Verificar o possível efeito depressor sobre o sistema nervoso.

2. METODOLOGIA

2.1. Obtenção da Própolis e Caracterização do Extrato

A própolis de coloração vermelha foi coletada das frestas das tampas de caixas produtoras de própolis do apiário localizado no Povoado Brejão dos Negros, Município de Brejo Grande no Estado de Sergipe, Brasil, em outubro de 2011 (S 10°28'25" e O 36°26'12"). O material coletado foi etiquetado e acondicionado em recipientes estéreis, encaminhados ao Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP) da Universidade Tiradentes (UNIT), onde a amostra foi pesada e refrigerada para posterior extração.

A extração foi realizada conforme método descrito por Maia-Araújo (2009). A amostra de própolis foi extraída com 12,5 mL de etanol a 70% durante 1 h em banho de ultrassom. O extrato obtido ao final do processamento foi filtrado, e o solvente eliminado por evaporação em capela de exaustão em temperatura ambiente por 48h. O material resultante (extrato seco) foi armazenado em frasco âmbar previamente identificado e em seguida conservado sob-refrigeração. A ressuspensão do extrato foi feita em concentrações de 20 mg/mL e as doses administradas foram de 3, 10 e 30 (LEDON et al., 1996; Barbosa, 2014).

A composição química do extrato hidroetanólico de própolis vermelha (EHPV) foi determinada usando método cromatográfico. Foi utilizado coluna de fase reversa (XP-ODS 50 x 3 mm; tamanho de partícula 2.2 µm) e detector com fotodiodo (Shimadzu Co.), utilizando metodologia descrita por Alencar et al.(2007), com modificações. O EHPV foi dissolvido em metanol (50 mg /mL) e filtrado com filtro de 0,45 µm (Millipore). Aliquotas de 2 µL de EHPV 1% (m/v) foram injetadas no sistema cromatográfico. Foi utilizado um gradiente de eluição linear de água (solvente A) e metanol (solvente B), iniciando com 40% de B e aumentando para 60% de B (após 22,5 min), elevando para 90% B (37.3- 42.3 min) e diminuindo para 30% de B (após 42,3 min) com um fluxo de solvente de 0,4 mL/min. O cromatograma foi construído no comprimento de onda de 260 nm e foi processado utilizando software LC solution. Os seguintes padrões de flavonóides e fenólicos foram utilizados: formononetina, quercetina, kaempferol, pinocembrina, 3-hidroxi-7-metoxiflavona, catechina, epicatechina, rutina, gallato de propila, ácido ferúlico e ácido p-coumarico.

O rendimento do processo de extração foi estimado com base no percentual da massa seca obtida, a qual foi calculada tendo como referência a massa inicial da própolis antes da extração (BRASIL, 2001).

2.2. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (30 – 40g), machos, adultos, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Sergipe (São Cristóvão, Brasil). Os animais foram mantidos em caixas de polietileno, em ambiente climatizado ($25\pm 2^{\circ}\text{C}$) com ciclo circadiano de 12 horas. Os animais foram aleatoriamente organizados em grupos e mantidos em caixas plásticas, com água e ração (Purina®) ad libitum, e a troca de serragem foi realizada a cada 2 dias. Os experimentos foram conduzidos durante o período das 7 às 17 h. Todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Tiradentes (protocolo número 011213) e atenderam às normas da Comissão Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

2.3. Avaliação da atividade antinociceptiva

2.3.1. Contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

As contorções abdominais foram induzidas pela injeção intra peritoneal de ácido acético (solução a 0,6%, 0,1 mL/10 g) em camundongos, onde foram mensuradas contrações no músculo abdominal e alongamento dos membros traseiros, (KOSTER; ANDERSON; DEBBER, 1959).

Os animais (camundongos Swiss, 20-30 g, n=6/grupo) foram pré-tratados com EHPV (3, 10 ou 30 mg/kg), ácido acetilsalicílico (AAS, 300 mg/kg, usado como controle padrão), ou veículo (Tween 80 a 0,2%, 0,1 mL/10 g, usado como controle negativo), por via oral, 60 min antes da aplicação do estímulo doloroso. As contorções foram contadas, por um mesmo avaliador, durante um período de 20 min, começando 5 min após a administração do ácido acético.

2.3.2. Teste da formalina

O teste da formalina foi realizado de acordo com o método descrito por Dubuisson e Dennis (1977) e posteriormente modificado por Hunskaar e Hole (1987). Os camundongos (n=6/grupo) foram pré-tratados com o HEPV (3, 10 ou 30mg/kg, via oral, 60 min antes), morfina (3 mg/kg; i.p., 30 min antes), AAS (300 mg/kg, via oral, 60 min antes) ou veículo (Tween 80 (0,2% em salina 0,9%, 0,1 mL/10 g, via oral, 60 min antes) e foi realizada a injeção sub plantar. da solução de formalina a 2% (20 µL/pata traseira direita). O tempo que o animal gastou lambendo ou mordendo a pata foi medido durante a primeira (0-5 min) e a segunda (15-30 min) fases do teste.

2.3.3. Teste da nocicepção induzida por glutamato

Os camundongos (n=6/grupo) foram pré-tratados com o HEPV (3, 10 ou 30mg/kg, via oral, 60 min antes), morfina (3 mg/kg; i.p., 30 min antes) ou veículo (Tween 80 (0,2% em salina 0,9%, 0,1 mL/10 g, via oral, 60 min antes) e foram submetidos à injeção sub plantar. de 20 µL de uma solução de glutamato (20 µmol/pata) na superfície ventral da pata posterior direita. Em seguida, os animais foram observados por um período de 15 min iniciados imediatamente após a injeção de glutamato em caixas espelhadas (BEIRITH et al., 2002). O tempo despendido pelos animais para lambar ou morder a pata injetada foi registrado com auxílio de cronômetro e considerado como indicativo de nocicepção.

2.4. Avaliação da atividade motora

Com o objetivo de detectar possíveis efeitos depressores ou estimulantes sobre o SNC, através da observação de aumento ou diminuição da atividade motora espontânea, foi utilizado o teste de campo aberto. Os camundongos (n = 5/grupo) receberam EHPV (50 mg/Kg, via oral), veículo (tween 80 a 0,2%, via oral) ou haloperidol (0,2 mg/Kg, i.p.) trinta minutos antes da avaliação. Foi utilizado um equipamento retangular (área 4.830,25 cm²), confeccionado em madeira branca, com paredes de 34,5 cm e a base subdividida em 16 quadrantes (Hongxing et al., 2007; O'Leary et al., 2013). Os parâmetros avaliados durante cinco minutos foram: explorações horizontais (número de quadrantes percorridos), explorações verticais (número de vezes em que o animal permanece sobre as patas posteriores) autolimpeza (grooming) (Whimbey & Denenberg, 1967).

2.5. Análise Estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos com média ± erro padrão da média (E.P.M.) e analisados utilizando-se a análise de variância (ANOVA) de uma via seguida do pós-teste de Bonferroni. Foi utilizado do programa Graph Pad Prism (versão 5.0). Valores de P<0,05 foram considerados estatisticamente significativos.

3. Resultados

3.1. Teste de contorções abdominais

O EHPV promoveu redução no número médio de contorções abdominais, de maneira dose dependente (46,6, 73,7 e 88,9%, respectivamente, a 3, 10 e 30 mg/Kg, $p < 0,001$, figura 2), enquanto o grupo tratado com o AAS (300 mg/Kg) apresentou uma redução de 83,7% ($p < 0,001$, figura 2).

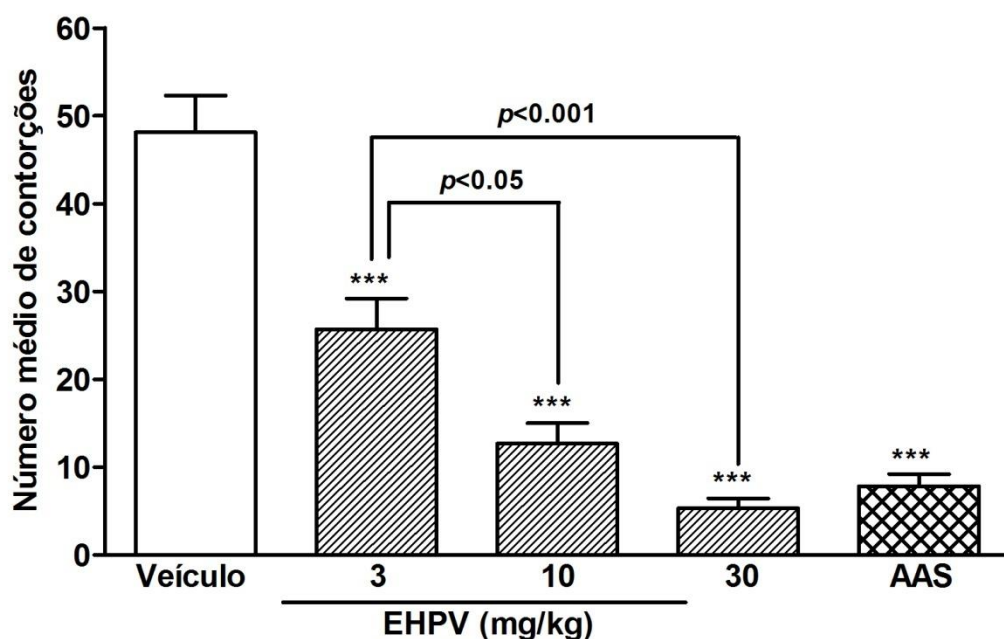


Figura 2. Efeito do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,6%. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. *** $p < 0,001$ em relação ao controle. ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni ($n = 6$ /grupo). AAS: ácido acetilsalicílico.

3.2. Teste de formalina

A aplicação de formalina induziu comportamento nociceptivo na primeira (neurogênica) e segunda (inflamatória) fase do teste ($72 \pm 3,8$ e $95,4 \pm 8,2$ segundos, respectivamente, figura 3). O tratamento com EHPV a 30 mg/Kg produziu redução significativa na fase neurogênica (61%) e todas as doses testadas reduziram a fase inflamatória (77,2, 75,8 e 83,7% a 3, 10 e 30 mg/Kg, $p < 0,001$, figura 3). De maneira similar, a morfina (3 mg/Kg) causou inibição significativa de 62,1 e 91,4% na primeira e segunda fases ($p < 0,001$) e o AAS (300 mg/Kg) causou inibição de 35,8 e 82%, respectivamente ($p < 0,001$, figura 3).

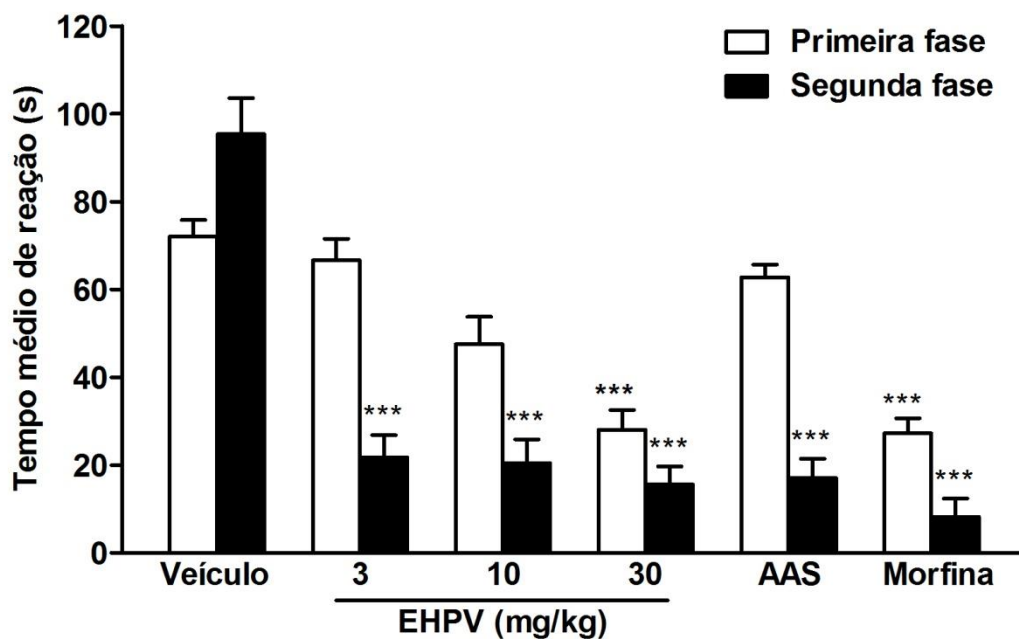


Figura 3. Efeitos do extrato hidroetanólico da própolis vermelha (EHPV) sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%, 20 μ L) na primeira (neurogênica) e segunda fase (inflamatória) do teste. Valores expressos como média $\pm$ E.P.M do tempo gasto lambendo ou mordendo a pata (reação). *** $p < 0.001$ em relação ao grupo veículo, ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni ($n = 6$ /grupo). AAS: ácido acetilsalicílico.

3.3. Teste de glutamato

O tratamento oral com EHPV atenuou a nocicepção induzida por glutamato na dose de 30 mg/kg (74,1%, $p < 0,001$, figura 4). Resultado semelhante foi observado para a morfina (3 mg/Kg; 75,9% $p < 0,001$).

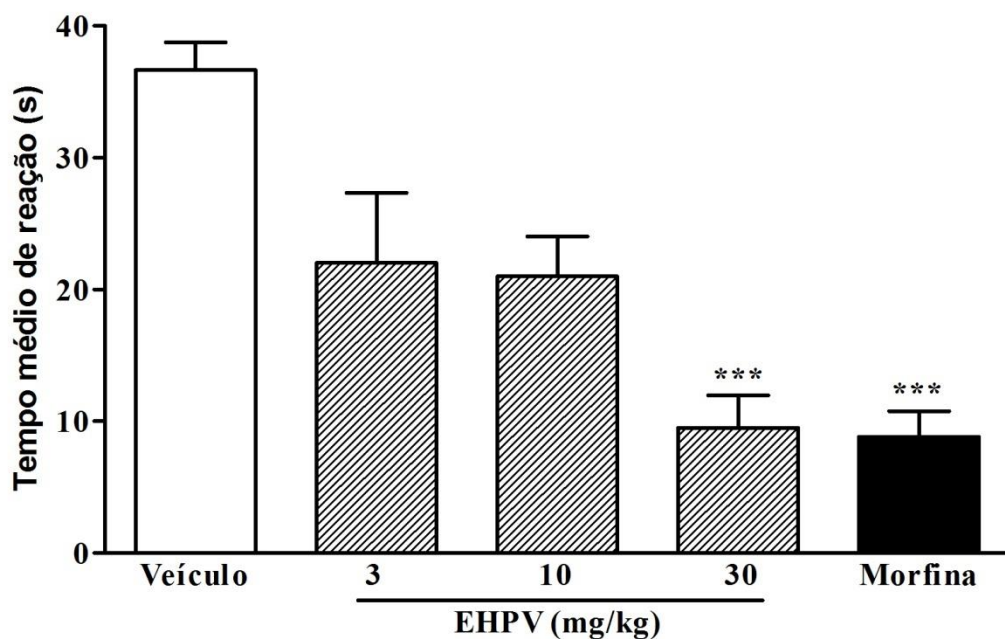


Figura 4. Efeito do extrato hidroetanolico da própolis vermelha e da formononetina sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato (20 μ mol/pata). Valores expressos como média $\pm$ E.P.M. *** $p < 0,001$ em relação ao grupo veículo. ANOVA seguida pelo pós – teste Bonferroni ($n = 6$ /grupo).

3.4. Teste do campo aberto

Nenhuma modificação foi observada após tratamento com EHPV (50 mg/Kg, via oral) com relação aos parâmetros avaliados no teste de campo aberto. Por outro lado, o haloperidol (0,2 mg/kg, i.p.) reduziu as explorações horizontais ($p < 0,001$), as explorações verticais ($p < 0,001$) e o comportamento de auto-limpeza ($p < 0,05$, tabela 1).

Tabela 2: Resultados do teste de campo aberto

Tratamento	Explorações horizontais	Explorações verticais	Auto- limpeza
Veículo	133.20 ± 8.69	31.80 ± 6.89	3.80 ± 1.32
EHPV (50 mg/kg, via oral)	144.80 ± 6.81	33.80 ± 2.89	4.00 ± 1.14
Haloperidol (0,2 mg/Kg, i.p.)	75.50 ± 4.25***	10.75 ± 4.78**	1.26 ± 0.25*

EHPV: Extrato hidroetanólico de própolis vermelha; ***p<0,0001, **p<0,001, *p<0,05 em relação ao veículo, ANOVA seguida pelo pós-teste Bonferroni (n = 6/grupo).

4. Discussão

No presente trabalho, a atividade antinociceptiva do EHPV foi avaliada in vivo utilizando estímulos químicos. Os testes aplicados visaram elucidar os possíveis mecanismos de ação, central e/ou periférica, do EHPV.

Para avaliação do efeito do EHPV na nocicepção periférica foi utilizado primeiramente o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, que é considerado um modelo de dor visceral (Collier et al., 1968). Neste modelo, a dor é gerada indiretamente através de mediadores endógenos (Julius and Basbaum, 2001; Serhan and Haeggström, 2010) como a histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas (Duarte et al., 1988) e citocinas pró-inflamatórias [fator de necrose tumoral (TNF)- α , interleucina (IL)-1 β e IL-8] produzidas por macrófagos e mastócitos (Ribeiro et al., 2000).

Estes mediadores inflamatórios são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, reduzir o limiar de nocicepção e estimular terminais de fibras nociceptivas aferentes (Martinez et al., 1999), através da ativação de canais iônicos sensíveis a ácidos ou de receptores de potencial transiente vanilóide do tipo 1 (TRPV1; Ykeda et al., 2001; Gavva et al., 2005; Premkumar and Abooj, 2013).

O EHPV reduziu as contorções de maneira dose-dependente, sugerindo ação anti-inflamatória. Em concordância com esta hipótese, estudos utilizando amostras de própolis vermelha Cubana (Ledón et al., 1997), própolis verde brasileira (Paulino et al., 2006) e própolis da Bulgária (Paulino et al., 2003) reportaram ação anti-inflamatória. A artepelina C, por exemplo, um composto encontrado em grande quantidade na própolis verde, apresentou ação anti-inflamatória periférica com redução de neutrófilos e edema e diminuição dos níveis de prostaglandinas in vivo. Os autores também observaram redução da produção de óxido nítrico e da atividade do fator nuclear- κ B (NF- κ B) in vitro (Paulino et al., 2008). Outra variedade de própolis, a geoprópolis proveniente da região Nordeste do Brasil, também mostrou resultado antinociceptivo na dor periférica, promovendo a redução na produção de TNF- α e IL-1 β (Franchin et al., 2012).

Cabe ressaltar ainda que o EHPV apresenta elevada quantidade de flavonoides em relação a outras amostras e estes compostos químicos possuem atividades antinociceptiva e anti-inflamatória: eles são capazes de inibir as lipo-oxigenases, a ciclo-oxigenase (COX)-2, a histamina, fosfolipases, glutathione-S-transferase e NADPH-oxidase e suprimir a ativação do NF- κ B (Odontuya et al., 2005; Rathee et al., 2009; Zhang et al., 2012). Foi demonstrado ainda que os flavonoides apresentam atividade antinociceptiva por modularem a expressão de genes pró-

inflamatórios que codificam a síntese de COX-2 e sintase de óxido nítrico induzida (iNOS; Liang et al., 1999; Righi et al., 2013).

Mais especificamente, importantes constituintes do EHPV como a daidzeína, quercetina e canferol (Alencar et al., 2007; Dausch et al., 2008), reduzem a formação de NO em resposta a estímulos inflamatórios (Hämäläinen et al., 2007).

Deve ser considerado ainda que ácidos fenólicos presentes no EHPV (Righi et al., 2011) poderiam antagonizar a ação nociceptiva do ácido acético, por competirem com canais iônicos sensíveis a ácidos.

O teste da formalina foi utilizado para a avaliação da resposta nociceptiva neurogênica e a elucidação da resposta periférica inflamatória. Este teste consiste de duas fases, sendo que a primeira (neurogênica) é acusada pela ativação de nociceptores através de TRPA1 (McNamara et al., 2007), enquanto a segunda (inflamatória) é mediada por uma combinação de entrada periférica e sensibilização de neurônios na medula espinal (Hunskar and Hole, 1987). Além disso, enquanto o teste de contorções é sensível a drogas com ação tanto central quanto periférica (Hendershot and Forsaith, 1959; Chernov et al., 1967; Pearl et al., 1968; Loux et al., 1978), no teste de formalina observa-se um efeito diferencial para drogas com ação central e periférica. Assim, compostos com ação central diminuem ambas as fases enquanto compostos com ação periférica, como os AINEs, agem bloqueando apenas a segunda fase (Shibata et al., 1989).

Neste sentido, tanto o EHPV (30 mg/Kg) quanto a morfina (3 mg/kg) diminuíram a resposta na primeira e segunda fases do teste, enquanto o AAS (300 mg/Kg) reduziu apenas a segunda fase. Os resultados para estas drogas padrão são consistentes com estudos prévios (Malmberg and Yaksh, 1992) e indicam que o EHPV age tanto na nocicepção central quanto periférica. EM adição, os resultados corroboram que o EHPV e/ou seus componentes possuem atividade anti-inflamatória.

Com relação à atividade anti-inflamatória, cabe discutir que a análise química do EHPV evidenciou um pico cromatográfico identificado como a isoflavona formononetina. Este dado está de acordo com trabalhos anteriores (Dausch et al., 2008; Righi et al., 2011) e foi demonstrado que a formononetina exibe atividade anti-inflamatória, sendo capaz de reduzir a ação de IL-1 β e NF- κ B in vitro (Wang et al., 2012). Além disso, a formononetina apresentou ação neuroprotetora in vivo através de efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes, onde foi evidenciada redução de TNF- α and IL-6 (Li et al., 2014) e aumento da superóxido dismutase (Ma et al., 2013). Dessa

forma, a ação de redução da nocicepção periférica do EHPV poderia ser mediada, ao menos em parte, pela formononetina.

Para uma melhor compreensão dos efeitos associados à nocicepção neurogênica, foi realizado o teste com o glutamato. O glutamato é um importante neurotransmissor no SNC. Periféricamente, está envolvido na transmissão da resposta dolorosa, tanto na deflagração do estímulo quanto na modulação e manutenção da resposta (Beirith et al., 2002). Além disso, estudos mostram que o glutamato é importante para a transmissão espinal e supraespinal da dor (Aanonsen et al., 1990; Mao et al., 1992; Fundytus, 2001). No presente estudo, foi observado que o EHPV (30 mg/Kg) promoveu efeito antinociceptivo sobre a resposta induzida por glutamato. A ação do glutamato envolve receptores metabotrópicos e ionotrópicos [N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA], que estão associados à ativação da via de síntese do NO (Dickenson and Sullivan, 1987; Beirith et al., 2002) e também é modulada por receptores TRPA1 (Klafke et al., 2012).

O NO e outras espécies reativas de oxigênio (EROs) tem sido implicados no dano tecidual e subsequente resposta nociceptiva (Schmidtke et al., 2008; Heine et al., 2011). Em adição, os EROs aumentam a transmissão sináptica excitatória no corno dorsal da medula espinal, através da ativação de TRPA1 e TRPV1 (Nishio et al., 2013). Considerando que o EHPV e seus componentes apresentam potente atividade antioxidante (Righi et al., 2011; Frozza et al., 2013), o efeito antinociceptivo observado neste estudo pode ser atribuído também à sua capacidade de sequestrar radicais livres.

Em conjunto, os achados dos testes de formalina e glutamato indicam que o EHPV tenha efeitos na nocicepção inflamatória e neurogênica. Embora uma dose maior de EHPV tenha sido necessária para obtenção de efeitos similares à morfina, o EHPV não promoveu efeitos adversos na atividade motora espontânea, conforme observado no teste de campo aberto. Dessa forma, o EHPV pode vir a representar uma alternativa terapêutica em relação aos opióides.

Em adição, efeitos do EHPV com menores doses foram observados no teste de contorções. Este teste é considerado mais sensível, pois elicia o efeito antinociceptivo com doses inferiores às utilizadas em outros testes (Bentley et al., 1983), devido à interação direta dos compostos testados com receptores periféricos na cavidade peritoneal (Bentley et al., 1981).

Em conclusão, os resultados indicam que o EHPV apresente efetiva ação nociceptiva central e periférica.

5. Conclusões

O EHPV apresentou em sua composição química a isoflavona formononetina que tem reportada ação anti-inflamatória. Quando avaliada a atividade antinociceptiva frente a estímulos químicos, o EHPV diminuiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético e reduziu o tempo de reação produzida pela injeção plantar de formalina (primeira e segunda fases) e de glutamato. Portanto, embora mais estudos sejam necessários para avaliar o mecanismo de ação subjacente, os resultados indicam que o EHPV apresente ação antinociceptiva central e periférica (inflamatória) e pode vir a representar uma nova abordagem terapêutica para o tratamento da dor e inflamação.

6. Referências

AANONSEN, L.M.; LEI, S.; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord. *Pain*. v.41, p.309–321. 1990.

ADELMANN, J. **Própolis: Variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana / antioxidante**. Universidade Federal do Paraná (UFPR). Curitiba. Dissertação de mestrado, 2005.

AGOSTINI, S.; EUTAMENE, H.; BROCCARDO, M.; IMPROTA, G.; PETRELLA, C. Peripheral anti-nociceptive effect of nociceptin/orphanin FQ in inflammation and stress-induced colonic hyperalgesia in rats. *Pain*, v.141, p. 292-299, 2009.

ALBUQUERQUE-JÚNIOR, R. L. C.; BARRETO, S. A. L.; PIRES, A. J; REIS, P. F.; LIMA, O. S.; RIBEIRO, G. M. A.; CARDOSO, C. J. Effect of bovine type-I collagen-based films containing red propolis on dermal wound healing in rodent model. *Int. J. Morphol.* v. 27, n.4, p.1105-1110, 2009.

ALENCAR, S. M.; OLDONI, T. L.; CASTRO, M. L.; CABRAL, I. S.; COSTA-NETO, C. M.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol*, v.113, n. 2, p.78-83, 2007.

ALMEIDA, E.B.; CARDOSO, J.C.; DE LIMA, A.K.; DE OLIVEIRA, N. L.; PONTES-FILHO, N. T.; LIMA, S.O.; SOUZA, I.C.L.; ALBUQUERQUE – JÚNIOR, R.L.C. The incorporation of Brazilian própolis into collagen – based dressing films improves dermal burn healing. *Journal of Ethnopharmacology*, v.147, p.419–425, 2013.

ARNOLD, L.M.; CLAUW, D.; WANG, F.; AHL, J.; GAYNOR, P.J.; WOHLREICH, M.M. Flexible dosed duloxetine in the treatment of fibromyalgia: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *J Rheumatol*, v.37, p.2578–86, 2010.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; BARON, R. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. *Eur J Neurol*, v.17, p.1113–1188, 2010.

ATTAL, N.; CRUCCU, G.; HAANPAA, M. EFNS guidelines on pharmacological treatment of neuropathic pain. *Eur J Neurol*; v.13, p.1153–1169, 2006.

AZEVEDO, L. F.; COSTA-PEREIRA, A.; MENDONÇA, L.; DIAS, C.C.; CASTRO-LOPES, J.M. Epidemiology of Chronic Pain: A Population-Based Nationwide Study on Its Prevalence, Characteristics and Associated Disability in Portugal. *The Journal of Pain*, v. 13, n. 8, p, 773-783, Agosto, 2012.

BANKOVA, V. S.; CASTRO, S. L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*, v. 31, p. 3-15, 2000.

BARBOSA, M. H.; ZUFFI, F. B.; MARUXO, H. B.; JORGE, L. L. R. Ação terapêutica da própolis em lesões cutâneas. *Acta Paul Enferm*.v.22, n.3, p.18-22. 2009.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova Brasil**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-284, 2009.

BECKER, D.; GARY, D. S.; ROSENZWEIG, E. S.; GRILL, W. M.; MCDONALD, J.W. Functional electrical stimulation helps replenish progenitor cells in the injured spinal cord of adult rats. **Experimental Neurology**, v. 222, p. 211–218, 2010.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219–228, 2002.

BENTLEY, M.M.; WILLIAMSON, J.H.; OLIVER, M.J. The effects of molybdate, tungstate and lxd on aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase in *Drosophila melanogaster*. **Canad. J. Genet. Cytol.** v.23, n.4, p. 597--609, 1981.

BERRETTA, A. A.; NASCIMENTO, A. P.; BUENO, P. C. P.; VAZ, M. M. DE O. L. L.; MARCHETTI, J. M. Propolis Standardized Extract (EPP-AF®), an Innovative Chemically and Biologically Reproducible Pharmaceutical Compound for Treating Wounds. **Int. J. Biol. Sci.** v. 8, n. 4, p. 512-521, 2012.

BERTA, T., LIU, T., LIU, Y.C., XU, Z.Z., JI, R.R. Acute morphine activates satellite glial cells and up-regulates IL-1beta in dorsal root ganglia in mice via matrix metalloprotease-9. **Mol Pain**, v.8, p.18, 2012.

BINSHTOK, A.M., WANG, H., ZIMMERMANN, K., AMAYA, F., VARDEH, D., SHI, L. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. **J Neurosci**, v.28, p. 14062-14073, 2008.

BLOCH, G.; FRANCOYB, T. M.; WACHTELC, I.; PANITZ-COHENC, N.; FUCHSD, S.; MAZAR, A. Industrial apiculture in the Jordan valley during Biblical times with Anatolian honeybees. **PNAS**, v. 107, n. 25, p.11240–11244, June, 2010.

BOTTEGA, F.H., FONTANA, R.T. Pain as the fifth vital sign: use of the assessment scale by nurses in general hospital. **Rev Latinoam Enferm**, v.19, n.2, p.283-90, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: Rename** ed. 7, Brasília, p. 250, 2011.

BREIVIK, H.; COLLETT, B.; VENTAFRIDDA, V.; COHEN, R.; GALLACHER, D. Survey of chronic pain in Europe: Prevalence, impact on daily life, and treatment. **Eur J Pain**, v.10, p.287-333, 2005.

CALIL, A.M., PIMENTA, C.A. Gravity of injury and analgesia in patients who suffered traffic accidents. **Acta Paul Enferm.**, v.21, n.3, p.398-403, 2008.

CANDELARIO-JALIL, E., YANG, Y., ROSENBERG, G.A. Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metallo proteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. **Neuroscience**, v.158, p.983-994, 2009.

CARROLL, I.; YOUNGER, J.; MACKEY, S. Pain quality predicts lidocaine analgesia among patients with suspected neuropathic pain. **Pain Medicine**, v.11, n.4, p. 617-621, 2010.

CASTRO, M. L.; NASCIMENTO, A. M.; IKEGAKI, M.; COSTA-NETO, C. M.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Identification of a bioactive compound isolated from Brazilian propolis type 6. **Bioorg Med Chem**. v.17, n.14, p. 5332-5335, 2009.

CATALA, E.; REIG, E.; ARTES, M.; ALIAGA, L.; LOPEZ, J.S.; SEGU, J.L. Prevalence of pain in the Spanish population: Telephone survey in 5000 homes. **Eur J Pain**, v.6, p.133-140, 2002.

CERVERO, F.; LAIRD, J. One pain or many pains?. **Physiology**, vol. 6, n. 6, p. 268–273, 2008.

CHAIAMNUAY, S.; BERTOLI, A.M.; FERNÁNDEZ, M. APTE, M.; VILÁ, L.M.; REVEILLE, J.; ALARCÓN, G.S. The impact of increased body mass index on systemic lupus erythematosus: data from LUMINA, a multiethnic cohort. *Journal of Clinical Rheumatology*, v. 13, p. 120-33, 2007.

CHEN, J.; LONG, Y.; HAN, M.; WANG, T.; CHEN, Q.; WANG, R. Water-soluble derivative of propolis mitigates scopolamine-induced learning and memory impairment in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. v.90, n.3, p.441-446, 2008.

CHEN, J.; ZHANG, L. C.; XING, Y. M.; WANG, Y. Q.; XING, X. K. Diversity and Taxonomy of Endophytic Xylariaceous Fungi from Medicinal Plants of Dendrobium (Orchidaceae). **PLoS ONE**. v. 8, n. 3, 2013.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemical Research**, v.33, n.10, p.1970-1978, 2008.

CHERNY, N.; RIPAMONTI, C.; PEREIRA, J.; DAVIS, C.; FALLON, M.; MCQUAY, H. Strategies to manage the adverse effects of oral morphine: an evidence-based report. **J Clin Oncol**, v.19, p.2542-2554, 2001.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of the fruit of *Foeniculum vulgare*. **Fitoterapia**; v.75, p.557–565. 2004.

CHRISTOPHER, R.; MCCURDY, S.; SCULLY, S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences** v.78, p.476 – 484, 2001.

CHRUBASIK, S.; JUNCK, H.; ZAPPE, H.A.; STUTZKE, O.A survey on pain complaints and health care utilization in a German population sample. **Eur J Anaesthesiol**, v.15, p.397-408, 1998

- COLLIER H. D. J.; DINNIN L. C.; JOHNSON C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J. Pharmac. Chemother.* v.32, p. 295 – 310. 1968.
- CUESTA-RUBIO, O.; FONTANA-URIBA, B.A.; RAMIREZ-APAN, T.; CARDENAS, J. Polyisoprenylated benzophenones in Cuban propolis: biological activity of nemorosone. *Z Naturforsch.*v.57, p.372–378, 2002.
- CUESTA-RUBIO, O.; PICCINELLI, A.L.; FERNANDEZ, M.C.; HERNÁNDEZ, I.M.; ROSADO, A.; RASTRELLI, L. Chemical characterization of Cuban propolis by HPLC-PDA, HPLC-MS, and NMR: the brown, red and yellow Cuban varieties of propolis. *J Agric Food Chem*, v.5, p.7502-7509, 2007.
- DALEPRANE J. B.; SCHMID, T.; DEHNE, N.; RUDNICKI, M.; MENRAD, H.; GEIS, T.; IKEGAKI, M.; ONG, T. P.; BRÜNE, B.; ABDALLA, D. S. Suppression of hypoxia-inducible factor-1 α contributes to the antiangiogenic activity of red propolis polyphenols in human endothelial cells. *J Nutr.*v.142, p. 441-7, 2012.
- DALEPRANE, J. B.; DA SILVA FREITAS, V.; PACHECO, A.; RUDNICKI, M.; FAINE, L. A.; DÖRR, F. A.; IKEGAKI, M.; SALAZAR, L. A.; ONG, T. P.; ABDALLA, D. S. Anti-atherogenic and anti-angiogenic activities of polyphenols from propolis. *J Nutr Biochem.*v. 23, p.557-566, 2011.
- DANIELSKI, J. C. R.. **Ciência em animais de laboratório: um paradigma atual na educação e pesquisa acadêmica.**2010.
- DAUGSCH, A.; MORAES, C. S.; FORT, P.; PARK, Y. K. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *ECAM.*, p.1-7, 2008.
- DELGADO-ZAMARREÑO, M. M.; PÉREZ-MARTÍN, L.; BUSTAMANTE-RANGEL, M.; CARABIAS-MARTÍNEZ, R. Pressurized liquid extraction as a sample preparation method for the analysis of isoflavones in pulses. *Anal Bioanal Chem.* v.18, 2012.
- DENNIS, C.; TURK, H. D.; WILSON, A. C. Treatment of chronic non-cancer pain.*Lancet.*v.377, p.2226–35, 2011.
- DICKENSON, A.H.; SULLIVAN, A.F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. *Neuroscience Letters.* v.83, p.207-211, 1987.
- DUBNER, R., BENNETT, G.J. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception.*Annu Rev Neurosci.*, v.6, p.381-418, 1983.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p. 161-174, 1977.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H.; OZER, B. In vitro antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropicalis*: a preliminary study. **Parasitol Res.** v.102, p.1217-1225, 2008.

DWORKIN, R.H.; O'CONNOR, A.B.; AUDETTE, J. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clin Proc**, v.85, n.3, p. S3–14, 2010.

FARMER, D.A.; AZIZ, Q. Gut pain & visceral hypersensitivity. **Brit J Pain.**, v.7, p.39-47, 2013.

FILLINGIM, R. B.; KING, C. D.; RIBEIRO-DASILVA, M. C.; RAHIM-WILLIAMS, B.; RILEY, J. L. Sex, gender, and pain: a review of recent clinical and experimental findings. **Journal of Pain**, vol. 10, n. 5, p. 447–485, 2009.

FRANCHI, G. C. JR.; MORAES, C. S.; TORETI, V. C.; DAUGSCH, A.; NOWILL, A. E.; PARK, Y. K. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. **Evid Based Complement Alternat Med.**, v. 2012, p. 1-6, 2012.

FRANCO, A.N; DE OLIVEIRA, C.B.; FERNANDES,G.; CASTANHARO,S. M.; GONÇALVES, D. A. G.; CAMPARIS, C. M. Sensibilidade dolorosa a la palpación en pacientes con disfunción temporomandibular crônica. **Rev Cubana Estomatol**, vol.48 no.4, Outubro-Dezembro. 2011

FRANCO, M. T. A., VEIGA, M. C. F. A., BEVILAQUA, B. G.. **Envolvimento do receptor opióide kapa na modulação da dor induzida pela formalina na atm de ratas prenhas e na fase estro**. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, da Universidade Estadual de Campinas. 2004.

FRICTON, J.R., DUBNER, R. Mecanismos da dor orofacial no tronco cerebral. *In*: Fricton Jr, Dubner. **Dor Orofacial e Desordens Temporomandibulares**. 1. ed.São Paulo: Santos;. p. 43-57. 2003.

FROZZA, R. C.; COSTA, J. A.; SIQUEIRA FILHO, G.; MARTINELLI, R. F.; MONTEIRO, F.; SANTOS-SILVA, D.P. SARAIVA. Bromeliaceae. Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2013.

FUNDYTUS, M.E.; YASHPAL, K.; CHABOT, J.G.; OSBORNE, M.G.; LEFEBVRE, C.D.; DRAY, A.; HENRY, J.L.; CODERRE, T.J. Knockdown of spinal metabotropic glutamate receptor 1 (mGluR(1)) alleviates pain and restores opioid efficacy after nerve injury in rats. **Br J Pharmacol**. v.132, p. 354–367. 2001.

FURLAN, A.D.; SANDOVAL, J.A.; MAILIS-GAGNON, A.; TUNKS, E. Opioids for chronic noncancer pain: a meta-analysis of effectiveness and side effects. **CMAJ**, v.174, p.1589–1594, 2006.

GAVVA, N.R.; KLIONSKY, L.; QU, Y.; SHI, L.; TAMIR, R.; EDENSON, S.; ZHANG, T.; VISWANADHAN, V.N.; TOTH, A.; PEARCE, L.V. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem.* v. 279, p. 20283–20295. 2005.

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A. V.; STEINBRUCH, M.; CUNHA, K. S.; RIBEIRO, M.; GONÇALVES, O. L. O.; DAVID, D. Use of diclofenac in clinical practice: review of the therapeutic evidence and pharmacologic actions. **Rev. Soc. Bras. Clín.Méd**, v.10, n.1, Janeiro-Fevereiro, 2012.

GOUDET C, MAGNAGHI V, LANDRY M, NAGY F, GEREAU RW. Metabotropic receptors for glutamate and GABA in pain. **Brain Res Rev.**, v.60, p.43–56, 2009.;

GUGGENHEIMER, J.; MOORE, P.A. The therapeutic applications of and risks associated with acetaminophen use: a review and update. **J Am Dent Assoc**, v.142, p.38–44. 2011.

GUREJE, O.; VON KORFF, M.; SIMON, G.E.; GATER, R. Persistent pain and well-being: A World Health Organization study in primary care. **JAMA**, v.280, p.147-151, 1998.

HAMALAINEN, P. I., TAKALA, J. AND LEENA SAARELA, K. Global Estimates of Occupational Accidents. *Safety Science.* v.44, n.16, p. 137-156. 2007.

HAYACIBARA, M.F.; KOO, H.; ROSALEN, P.L.; DUARTE, S.; FRANCO, E.M.; BROWEN, W.H.; IKEGAKI, M.; CURY, J.A. In vitro and vivo effects of isolated fractions of Brazilian propolis on caries development. **J Ethnopharmacol.** v.101, p.110-115, 2005.

HEINE, C.; BRUNE, S. DINNIN L. Breaking the Cratonic Equatorial Atlantic Bridge: Why there is no Saharan Ocean. Conference “Fragile Earth”. Munich, Germany. 2011.

HERNÁNDEZ-ORTEGA, M.; ORTIZ-MORENO, A.; HERNÁNDEZ-NAVARRO, D. M.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; DORANTES-ALVAREZ, L.; NECOECHEA-MONGRAGÓN, H. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annum* L.) **J Biomed Biotechnol.** Published online October 2, 2012.

HU, F.; HEPBURN, H.R.; LI, Y.; CHEN, M.; RADLOFF, S.E.; DAYA, S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. **J Ethnopharmacol.** v.100, p.276-283. 2005.

HUH, J.; NAM, D.; BAEK, Y.; KANG, J. W.; PARK, D.; CHOI, D.; LEE, J. Formononetin accelerates wound repair by the regulation of early growth response factor-1 transcription factor through the phosphorylation of the ERK and p38 MAPK pathways. **International Immunopharmacology.** v.11, p. 46–54, 2011.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

INOUE, H.T.; SOUSA, E.A.; ORSI, R. O.; FUNARI, S.R.C.; BARRETO, L.M.R.C.; DIB, A.P.S. Produção de própolis por diferentes métodos de coleta. **Asociación Latinoamericana de Producción Animal**. v.15, n.2, p. 65-69, 2007.

IZUTA H, NARAHARA Y, SHIMAZAWA M, MISHIMA S, KONDO S, HARA H. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging activity of bee products and their constituents determined by ESR. **Biol Pharm Bull**. v. 32 n.12, p.1947-1951, Dezembro, 2009.

JANE, D.E.; LODGE, D.; COLLINGRIDGE, G.L. Kainate receptors: Pharmacology, function and therapeutic potential. **Neuropharmacology**., v.56, p.90–113, 2009.

JI, J.; WERBOWETSKI-OGILVIE, T.E.; ZHONG, B.; HONG, S-H.; BHATIA, M. Pluripotent Transcription Factors Possess Distinct Roles in Normal versus Transformed Human Stem Cells. **PLoS ONE**. v.4, n.11 2009.

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

KAWASAKI, Y., XU, Z.Z., WANG, X., PARK, J.Y., ZHUANG, Z.Y., TAN, P.H. Distinct roles of matrix metalloproteases in the early and late-phase development of neuropathic pain. **Nat Med**; v.14, p.331-336, 2008.

KHALIL, M.L. Biological activity of bee propolis in health and disease. **Asian Pac J Cancer Prev.**, v.7, n.1, p.22-31, Janeiro-Março, 2006.

KHANDOGA, A., KESSLER, J.S., HANSCHEN, M., KHANDOGA, A.G., BURGGRAF, D., REICHEL, C. Matrix metalloproteinase-9 promotes neutrophil and T cell recruitment and migration in the postischemic liver. **J Leukoc Biol**, v.79, p.1295-1305, 2006.

KLAFKE, J.Z.; ARNOLDI DA SILVA, M.; FORTES ROSSATO, M.; TREVISAN, G.; BANDERÓ WALKER, C.I.; MARTINS LEAL, C.A.; OLSCHOWSKY BORGES, D.; CHITOLINA SCHETINGER, M.R.; NOAL MORESCO, R.; MEDEIROS FRESCURA DUARTE, M.M.; SOARES DOS SANTOS, A.R.; NAZÁRIO VIECILI, P.R.; FERREIRA, J.. Antiplatelet, antithrombotic and fibrinolytic activities of *Campomanesia xanthocarpa*. *Evid Based Complement Alternat Med*. v.2012, p. 9547-48. 2012.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da Dor. *Archives of Veterinary Science*. v.13, n.1, p.1-12. 2008.

KNOTKOVA, H.; FINE, P.G.; PORTENOY, R.K. Opioid rotation: The science and the limitations of the equianalgesic dose table. **JPain Symptom Manage**, v.38, p.426-439, 2009.

KORKMAZSKY, M.; GHANDEHARI, J.; SANCHEZ, A.; LIN, H.M.; PAPPAGALLO, M. Feasibility study of rapid opioid rotation and titration. **Pain Physician**, v.14, p.71-82, 2011.

KOSTER, R.; ANDERSON, N.; DEBBER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 418-420, 1959.

- LARSSON, M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. **Mol Neurobiol.**, v.40, p.260–288, 2009.
- LE BARS, D.L.; GOZARRIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, v. 53, p. 597-652. 2001.
- LEDON, N.; CASACÓ, A.; GONZÁLEZ, R.; MERINO, N.; GONZÁLEZ, A.; TOLÓN, Z. Efectos antipsoriásico, antiinflamatorio y analgésico del propóleo rojo colectado en Cuba. **Rev Cubana Farm**, v.30, p.36-42, 1996.
- LEDÓN, N.; CASACO, A.; GONZALEZ, R.; MERINO, N.; GONZALEZ, A.; TOLON, Z. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. **Acta Pharmacologia Sinica**.v.18, p. 274-276, 1997.
- LEE KS, KIM J, YOON YM, LEE MG, HONG SK, HAN HC. The peripheral role of group 1 metabotropic glutamate receptors on nociceptive behaviors in rats with knee joint inflammation. **Neurosci Lett.**, v.416, p.123–127, 2007.
- LI, B.Y.; YUAN, Y.H.; HU, J.F.; ZHAO, Q.; ZHANG, D.M.; CHEN, N.H. Protective effect of bu-7, a flavonoid extracted from clausena lansium, against rotenone injury in pc12 cells. **Acta Pharmacologica Sinica**, v.32, n.11, p.1321-1326, 2014.
- LIANG, S.; STRAHLER, A.; WALTHALL, C. Retrieval of land surface albedo from satellite observations: a simulation study. *Journal of Applied Meteorology*, v.38, p. 712 – 725. 1999.
- LIMA M.G. A produção de própolis no Brasil. **São João da Boa Vista**. São Sebastião Editora e Gráfica. 2006.
- LIO, A.; OHGUCHI, K.; INOUE, H.; MARUYAMA, H.; ARAKI, Y.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis promote adipocyte differentiation through PPAR γ activation. **Phytomedicine**, v.17, n.12, p.974-979, 2010.
- LIO, A.; OHGUCHI, K.; MARUYAMA, H.; TAZAWA, S.; ARAKI, Y.; ICHIHARA, K.; NOZAWA, Y.; ITO, M. Ethanolic extracts of Brazilian red propolis increase ABCA1 expression and promote cholesterol efflux from THP-1 macrophages. **Phytomedicine**. v. 15, p. 383-8, 2012.
- LOESER, D.; TREEDE, R. D.; The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, vol. 137, no. 3, p. 473–477, 2008.
- LÓPEZ, B. G. C. A; SCHMIDT, E. M. B.; EBERLIN, M. N. B.; SAWAYA, A. C. H. F. Phytochemical markers of different types of red própolis. **Food Chemistry**, v.146 pag.174–180. 2014.
- LOTFY, M. Biological Activity of Bee Propolis in Health and Disease. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 7, n. 1, p. 22-31, 2006.

LOTTI, C.; CAMPO FERNANDEZ, M.; PICCINELLI, A. L.; CUESTA-RUBIO, O.; MARQUEZ HERNANDEZ, I.; RASTRELLI, L. Chemical constituents of red Mexican propolis. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.58, n.4, p.2209–2213. 2010.

LUSTOSA, S. R.; GALINDO, A. B.; NUNES, L. C. C.; RANDAU, K. P.; ROLIM NETO, P. J. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev Bras Farmacognosia**.v.18, p.447-454, 2008.

MACKEY, S.; MAEDA, F. Functional Imaging and the Neural Systems of Chronic Pain.**Neurosurgery North American Clinics of North America**, Vol. 15, No. 3, p.269-288, 2004.

MACPHERSON, R. A.; FIEBRICH, C.; CRAWFORD, R. L.; ELLIOTT, J. R.; KILBY, D. L.; GRIMSLEY, J. E.; MARTINEZ, J. B.; BASARA, B. G.; ILLSTON, D. A.; MORRIS, K. A.; KLOESEL, S. J.; STADLER, A. D.; MELVIN, A.J. Statewide monitoring of the mesoscale environment: A technical update on the Oklahoma Mesonet. *J. Atmos. Oceanic Tech.* v.24, p. 301-321. 2007.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Hyperalgesia mediated by spinal glutamate or substance P receptor blocked by spinal cyclooxygenase inhibition. *Science* v. 257, p.1276-1279. 1992.

MANCHIKANTI, L.; DATTA, S.; DERBY, R. A critical review of the American Pain Society Clinical Practice Guidelines for interventional techniques: Part 1. Diagnostic interventions.**Pain Physician**; v.13, p.141–174, 2010.

MAO, Z.; NADAL-GINARD, B.; DRAY, A. Functional and physical interactions between mammalian achaete-scute homolog 1 and myocyte enhancer factor 2A. *J. Biol. Chem.* v.271, p. 14371-14375. 1992.

MARCUCCI, M. C. Propriedades biológicas e terapêutica dos constituintes químicos da própolis. **Quim Nova**; v.19, p.529-536, 1996.

MARCUCCI, M. C.; FERRERES, F.; GARCÍA-VIGUERA, C.; BANKOVA, V. S.; DE CASTRO, S. L.; DANTAS, A. P.; VALENTE, P. H.; PAULINO, N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. **J Ethnopharmacol**.v.74, p.105-112, 2001.

MARTINEZ, H. E. P.; CARVALHO, J. G.; SOUZA, R. B. Diagnose foliar. In: RIBEIRO, A. C.; GUIMARÃES, P. T. G.; ALVAREZ V., V. H. (eds.). *Recomendações para o uso de corretivos e fertilizantes em Minas Gerais. 5ª Aproximação*. Viçosa: UFV. p. 143-168. 1999.

MATSUDA, A.H.; MACHADO, L.B.; MASTRO, N.L. Thermal analysis applied to irradiated propolis. **Radiat Phys Chem.** v.63, p.353-355, 2002.

MCNAMARA, F.N.; RANDALL, A.; GUNTHORPE, M.J. Effects of piperine, the pungent component of black pepper, at the human vanilloid receptor (TRPV1). *Br J Pharmacol*. v.144, p.781–790. 2007.

MELNIKOVA, I. Pain market. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol. 9, no. 8, pp. 589–590, 2010.

MENDES, A. G. **Abordagem terapêutica da patologia inflamatória da articulação temporomandibular**. FCS (DCM) - Dissertações de Mestrado, USP. 2012

MENDONÇA, L. S. **Aspectos ambientais, químicos e biológicos relacionados a própolis vermelha**. Dissertação do Mestrado - Universidade Tiradentes/Sergipe. Programa de Pós-Graduação em Saúde e Ambiente. Aracaju, Brasil, 2010.

MENDONÇA, L. S.; MAIA-ARAÚJO, Y. L. F.; ORELLANA, S. C.; ARAUJO, E. D. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha. **Scientia Plena**. v.7, n.4, p.1-4, 2011.

MENEZES, H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. **ARQ. INST. BIOL.** v.72, p. 405-411, 2005.

MONZOTE, L.; CUESTA – RUBIO, O.; FERNANDEZ, M. C.; HERNANDEZ, M. I.; FRAGA, J.; PEREZ, K.; MAES, L.; COS, P. In vitro antimicrobial assessment of Cuban propolis extracts. **MEM INST OSWALDO CRUZ**, RIO DE JANEIRO, v.107, n.8, December. 2012.

NASCIMENTO, G.C., RIZZI, E., GERLACH, R.F., LEITE-PANISSI, C.R.A. Expression of MMP-2 and MMP-9 in the rat trigeminal ganglion during the development of temporomandibular joint inflammation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research** v.46, p.956-967. 2013.

NEWARIRY, A. S.; SALAMA, A. F.; HUSSIEN, H. M.; YOUSEF, M. I. Propolis alleviates aluminium-induced lipid peroxidation and biochemical parameters in male rats. **Food Chem Toxicol.** v. 47, p.1093-1098, 2009.

NISHIO, H.; SUGIYAMA, J.; YAGUCHI, T.; AOKI, D.; KAWAKAMI, Y. Immunosuppression through HNF-1b signaling in human ovarian clear cell cancer. *Journal for ImmunoTherapy of Cancer.* v.1, p.168. 2013.

OAKLANDER AL, RISSMILLER JG, GELMAN LB, ZHENG L, CHANG Y, GOTT R. Evidence of focal small-fiber axonal degeneration in complex regional pain syndrome-I (reflex sympathetic dystrophy). **Pain**, v.120, p.235-243, 2006.

OAKLANDER, A.L. Chronic pain. **ACP Medicine**. 2011.

OCCHIUTO F, PALUMBO DR, SAMPERI S, ZANGLA G, PINO A, DE PASQUALE R, CIRCOSTA C. The isoflavones mixture from *Trifolium pratense* L. protects HCN 1-A neurons from oxidative stress. **Phytother Res.** v. 23, n.2, 192-196, Febrero, 2012.

ODONTUYA, G.; HOULT, J.R.S.; HOUGHTON, PJ. Structure–activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. *Phytother Res.* v.19, p. 782-786. 2005.

OLIVEIRA, M. E.; PODEROSO, J. C. M.; FERREIRA, A. F.; RIBEIRO, G. T.; ARAÚJO, E. D. Apicultores do Estado de Sergipe. **Scientia Plena**. v. 6, n. 1, 2010.

OLIVEIRA, S. G. D.; MOURA, F. R. R.; DEMARCO, F. F.; NASCENTE, P. S.; PINO, F. A. B.; LUND, R. G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**.v.140, p. 428– 437, 2012.

OZKAN, O.; HAMZAOGLU, O.; ERDINE, S.; BALTA, E.; DOMAC, M. Use of analgesics in adults with pain complaints: prevalence and associated of factors. Turkey. **Rev. Saude publica**, v.43, p.140-146, 2009.

OZKUL, Y.;SILICI, S.; ERÖGLU, E. The anticarcinogenic effect of propolis in human lymphocytes culture.**Phytomedicine**.v.12, p.742-747, 2004.

PARADA, C.A., Tambeli, C.H., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H.The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception.**Neuroscience**., v.102, n.4, p. 937-44. 2002.

PARK, K.; LEE, Y.; PARK, S.; LEE, S.; HONG, Y.; KIL LEE, S.; HONG, Y. Synergistic effect of melatonin on exercise-induced neuronal reconstruction and functional recovery in a spinal cord injury animal model. **Journal of Pineal Research**.v. 48, n. 3, p. 270-81, 2010.

PASERO, C., MCCAFFERY, M. The patient's report of pain: Believing vs. accepting. There's a big difference. **Am J Nurs.**; v.101, n.12, p.73-74, 2001.

PATAPOUTIAN, A.; TATE, S.; WOOLF, C.J. Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. *Nat Rev Drug Discov*. v. 8, p. 55-68. 2009.

PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALADARES FILHO, S.C. Suplementação animal em pasto: energética ou proteica? SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM, Viçosa: SIMFOR. v.3, p.359-392. 2006.

PAULINO, M.F.; DETMANN, E.; VALENTE, E.E.L. Nutrição de bovinos em pastejo. SIMPÓSIO SOBRE MANEJO ESTRATÉGICO DA PASTAGEM. v. 4, p.131-169.2008.

PAULINO, M.F.; ZERVOUDAKIS, J.T.; MORAES, E.H.B.K. Bovinocultura de ciclo curto em pastagens. In: SIMPÓSIO DE PRODUÇÃO DE GADO DE CORTE, MG: DZO-UFV. v.3.p.153-196.2002.

PEREIRA, L.V., SOUSA, F.A. Psychophysical evaluation of the descriptors of pain in the postoperative. **Rev Latinoam Enferm.**,v.15, n.3, p.474-479, 2007.

PEREIRA. E. M. **Avaliação do papel de receptores nmda para glutamato na nocicepção orofacial aguda e crônica em ratos**. Dissertação de mestrado.Universidade Federal do Paraná, 2006.

PICCINELLI, A. L.; LOTTI, C.; CAMPONE, L.; CUESTA-RUBIO, O.; CAMPO FERNANDEZ, M.; RASTRELLI, L. Cuban and Brazilian red propolis: Botanical origin and comparative

analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.59, n.12, p.6484–6491. 2011.

POPOLO, A.; PICCINELLI, L.A.; MORELLO, S.; CUESTA-RUBIO, O.; SORRENTINO, R.; RASTRELLI, L.; Pinto, A. Antiproliferative activity of brown Cuban propolis extract on human breast cancer cells. **Nat Prod Commun**.v.4, p.1711-1716, 1996.

PREMKUMAR, L.S.; ABOOJ, M. TRP channels and analgesia. *Life Sci*. v. 92, p. 415–424. 2013.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V. AND KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm. Allergy Drug Targets*. v.8, p. 229-235. 2009.

RIBEIRO, R.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam/Holanda, v.387, n.1, p.111-118, 2000.

RIGHI, A. A.; ALVES, T. R.; NEGRI, G.; MARQUES, L. M.; BREYER, H.; SALATINO, A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. **J Sci Food Agric**.v. 91, n. 2, p 363-70, 2011.

RIGHI, M.; HENDRICKS, J.; AND SAUSEN, R. The global impact of the transport sectors on atmospheric aerosol: simulations for year 2000 emissions, *Atmos. Chem. Phys. Discuss*. v.13, p. 13119– 13189. 2013.

ROCHA, L.; DOS SANTOS, L.R.; ARCENIO, F.; CARVALHO, E.S.; LÚCIO, E.M.R.A.; ARAÚJO, G.L.; TEIXEIRA, L.A.; SHARAPIN, N. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. **Rev Bras Farmacogn** v.13, p.71-74. 2003.

ROELOFS, P.D.; DEYO, R.A.; KOES, B.W.; SCHOLTEN, R.J.; VAN TULDER, M.W. Non-steroidal anti-inflammatory drugs for low back pain. **Cochrane Database Syst Rev**, v.1, 2008.

RUSTOEN, T.; WAHL, A.K.; HANESTAD, B.R.; LERDAL, A.; PAUL, S.; MIASKOWSKI, C. Prevalence and characteristics of chronic pain in the general Norwegian population. **Eur J Pain** v.8, p.555-565, 2004.

SALIGRAM, S., BIELEFELDT, K. **Opioids and Cyclical Vomiting Syndrome Gastroenterology**, v. 140, Issue 5, Supplement 1, Pages S-805-S-806. 2011.

SALLUM, A.M.C.; RIBEIRO, M.C.O.; PEREIRA, C. U.; MARTINS-FILHO, P.R.S.; NUNES, M.A.S.; CARVALHO, M.B.T. Postoperative pain in patients submitted to elective craniotomy. *Rev Dor*. v. 13, n. 3, Jul-sep, pag. 229-34. 2012.

SALOMÃO, K.; PEREIRA, P.R.; CAMPOS, L.C.; BORBA, C.M.; CABELLO, P.H.; MARCUCCI, M.C.; DE CASTRO, S.L. Brazilian propolis: correlation between chemical composition and antimicrobial activity. **Evid Based Complement Alternat Med.** v.5, p.317-324, 2008.

SALVETTI, M.G., PIMENTA, C.A. Chronic pain self-efficacy scale portuguese validation. **Rev Psiquiatr Clín.**v.32, n.4, p.202-210, 2005.

SANTOS, C.M., PIMENTA, C.A., NOBRE, M.R. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Rev Latinoam Enferm.**, v.15, n.3 p.508-511, 2007.

SCHMITT, E. K.; MOORE, C. M.; KRASTEL, P.; PETERSEN, F. Natural products as catalysts for innovation: a pharmaceutical industry perspective. **Current Opinion in Chemical Biology.**v. 15, n. 4, p. 497-504, 2011.

SEBRAE . Origem garantida: Empreender. **Globo Rural**, v.323, p.1–3. 2012.

SEBRAE. **Histórias de Sucesso: experiências empreendedoras.**2003.

SEE, S.; GINZBURG, R. Choosing a skeletal muscle relaxant. **Am Fam Physician**; v.78, p.365–370, 2008.

SERRANO-AGUILAR, P., KOVACS F. M., CABRERA-HERNÁNDEZ, J. M., RAMOS-GOÑI, J. M., GARCÍA-PÉREZ, L. Avoidable costs of physical treatments for chronic back, neck and shoulder pain within the Spanish National Health Service: a cross-sectional study. **BMC Musculoskelet Disord.**, v. 21, p.12:287, 2011.

SESSLE B.J. Acute and chronic craniofacial pain: brainstem mechanisms of nociceptive transmission and neuroplasticity, and their clinical correlates. **Crit Rev Oral Biol Med.**, v.11, n.1, p.57-91. 2000.

SFORCIN, J. M.; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs?. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 133, p. 253–260, 2011.

SHERMAN, D.; HAEGGSTROM, J. Z. Arginine 104 is a key catalytic residue in leukotriene C4 synthase. **J. Biol. Chem.** v. 285, p. 40771–40776. 2010.

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

SILVA, B. B. **Caracterização da própolis vermelha: sua origem botânica e o efeito sazonal sobre sua composição química e atividade biológica.** Dissertação de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba/SP, 2009.

SIQUERA, A.B.S.; GOMES, B. S.; CAMBUIM, I.; MAIA, R. S.; SOUZA-MOTTA, C.M.; QUEIROZ, L. A.; PORTO, A. L. F. Trichophyton species susceptibility to green and red propolis from Brazil. **Applied Microbiology.** v. 48, p. 90–96, 2009.

SOMERS, D. L.; CLEMENTE, F. R. Contralateral high or a combination of high and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and

alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. **J. Pain.**, v.10, n.2, p. 221-229, 2009.

SOUSA, C.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; SILVA, B. B.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M.; Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian Própolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.** v. 5, p. 313-316, 2007.

SPEARS, R., DEES, L.A., SAPOZHNIKOV, M., BELLINGER, L.L., HUTCHINS, B.. Temporal changes in inflammatory mediator concentrations in an adjuvant model of temporomandibular joint inflammation. **J Orofac Pain**, v.19, p.34-40. 2005.

SUN, M.; ZHOU, T.; ZHOU, L.; CHEN, Q.; YU, Y.; YANG, H. Formononetin protects neurons against hypoxia-induced cytotoxicity through upregulation of ADAM10 and sA β PP α . **J Alzheimers Dis.** v.28, p.795-808, 2012.

SUN, M.; ZHOU, T.; ZHOU, L.; CHEN, Q.; YU, Y.; YANG, H.; ZHONG, K.; ZHANG, X.; XU, F.; CAI, S.; YU, A.; ZHANG, H.; XIAO, R.; XIAO, D.; CHUI, D. Formononetin protects neurons against hypoxia-induced cytotoxicity through upregulation of ADAM10 and sA β PP α . **J Alzheimers Dis.** v. 28, n.4, p.795-808. 2012.

SYDNEY, P.B.H.; CONTI, P.C.R. Diretrizes para avaliação somatossensorial em pacientes portadores de disfunção temporomandibular e dor orofacial. *Rev Dor.* v. 12, n. 4, out-dez, p.349-53. 2011.

TAMBELLI, R.; LAGHI, F.; ODORISIO, F.; NOTARI, V. Attachment relationships and internalizing and externalizing problems among Italian adolescents: age and gender differences. *Children and youth services review.* v.34, p. 1465–1471. 2012.

TEIXEIRA, M.J., TEIXEIRA, W.G.J., KRAYCHETE, D.C. Epidemiologia geral da dor. **Dor: contexto interdisciplinar.** Curitiba: Maio; p. 53-66, 2003.

TOITET, K. D.; NUTHELEZI, S.; BODENSTEIN, J. Anti-inflammatory and antibacterial profiles of selected compounds found in South African propolis. **South African Journal of Science.** v. 105, n. 11-12, p. 470-472, 2009.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; BANKOVA, V.; SIMOVA, S.; MARCUCCI, M.C.; MIORIN, P.L.; PASIN, F.R.; TSVETKOVA, I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. **e-CAM.** v. 3, p. 249- 254, 2006.

TRUSHEVA, B.; POPOVA, M.; NAYDENSKI, H.; TSVETKOVA, I.; GREGORIO RODRIGUEZ, J.; BANKOVA, V. New polyisoprenylated benzophenones from Venezuelan propolis. **Fitoterapia**, v.75, n.7–8, p.683–689, 2004.

TURK, D.C.; OKIFUJI, A. Psychological factors in chronic pain: evolution and revolution. **J Consult Clin Psychol.** v.70, n.3, p.678-690, Junho, 2002.

VERDU, B.; DECOSTERD, I.; BUCLIN, T.; STIEFEL, F.; BERNEY, A. Antidepressants for the treatment of chronic pain. **Drugs**, v.68, p.2611–2632, 2008.

VISSERS, K.C.P.; BESSE, K.; HANS, G.; DEVULDER, J.; MORLION, B. Opioid Rotation in the Management of Chronic Pain: Where Is the Evidence? **Pain Pract**, v.2, p.85-93, 2010.

VOLPI, N.; BERGONZINI, G. Analysis of flavonoids from propolis by on-line HPLC-electrospray mass spectrometry. **J Pharm Biomed Anal** v.42, p.354-361, 2006.

WANG, W. C.; LIANG, S. L.; CHEN, Y. K.; LIN, L. M. The therapeutic effect of fractionated radiation on DMBA-induced hamster buccal pouch squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**.v.44, p.1160-1166, 2008.

WELLS, T. N. C. Natural products as starting points for future anti-malarial therapies: going back to our roots? **Malaria Journal**.v. 10, n. 1, p. 2-12, 2011.

WHIMBEY, A. E.; DENENBERG, V. H. Two independent behavioral dimensions in open field performance. *Journal of Comparative Physiology and Psychology*. v.63, p. 500–504. 1967.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules? *Free Radical*. **Biology and Medicine**. v. 36, p. 838-849, 2004.

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**.v.55, n.3, p.353-364, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Atlas of headache disorders and resources in the world**. Geneva: Who Press; 2011.

YE, Y.; HOU, R.; CHEN, J.; MO, L.; ZHANG, J.; HUANG, Y.; MO, Z. Formononetin-induced apoptosis of human prostate cancer cells through ERK1/2 mitogen-activated protein kinase inactivation. **Horm Metab Res**. v. 44, n. 4, p. 263-267. 2012.

YKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acetic acid-induced writhing response of mice. *Life Sci*. v. 69, p. 2911-2919.2001.

YOUNG, K.D. Pediatric procedural pain. *Ann Emerg Med*. v. 45, n. 2, p.160-71. 2005.

YOUNGER, J.; CHU, L.; D'ARCY, N.; TROTT, K.; JASTRZAB, L.; MACKEY, S. Prescription opioid analgesics rapidly change the human brain. **Pain**, v.152, n.8, p.1803-1810, 2011.

YU, H.Y.; TANG, F.I.; KUO, B.I.; YU, S. Prevalence, interference, and risk factors for chronic pain among Taiwanese community older people. **Pain Manag Nurs**, v.7, p.2-11, 2006.

ZHANG, W.G.; ZHANG, L.C.; PENG, Z.D.; ZENG, Y.M. Intrathecal injection of GluR6 antisense oligodeoxynucleotides alleviates acute inflammatory pain of rectum in rats. **Neurosuc Bull.**, v.25 ,p.319–323, 2009.

ARTIGO – Antinociceptive and gastroprotective effects of Brazilian red propolis extract

Title: Antinociceptive and gastroprotective effects of Brazilian red propolis extract

Rodrigo Lima Cavendish^a, Jandson S. Santos^b, Marcio André Andrade de Mendonça^a, Ana Roseli S. Ribeiro^b, Andresa Aparecida Berretta e Silva^c, Francisco Prado Reis^a, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior^a, Margarete Zanardo Gomes^a, Sara M. Thomazzi^b, Juliana Cordeiro Cardoso^a

^a*Instituto de Tecnologia e Pesquisa (ITP), Universidade Tiradentes, Av. Murilo Dantas, 300, Farolândia, CEP 49032-490, Aracaju, Sergipe, Brazil*

^b*Departamento de Fisiologia, Universidade Federal de Sergipe, Av. Marechal Rondon, Cidade Universitária, CEP 49100-000, São Cristóvão, Sergipe, Brazil*

^c*University of São Paulo, Faculty of Pharmaceutical Sciences of Ribeirão Preto, Av. do Café, s/n 14049-900, Ribeirão Preto/SP, Brazil*

*Author for correspondence:

Sara Maria Thomazzi, PhD

Department of Physiology

Center of Biological and Health Sciences

Federal University of Sergipe

49100-000, São Cristóvão (SE), Brazil

Phone: +55 79 21056640

FAX: +55 79 21056474

E-mail: sthomazzi@gmail.com (S.M. Thomazzi)

Abstract

Ethnopharmacological relevance: Propolis has been used as a folk medicine for centuries around the world due to exhibit a wide spectrum of biological activities. Red propolis, a new Brazilian variety of this apimaterial, presented unusual chemical composition, including isoflavones, such as formononetin and biochanin A. Since both propolis are traditionally used as medicine and commercialized with no label differentiation, the study of the red propolis extract activities become important to clarify if this product has the same activities from the commercial ones. In this work, we demonstrated the potential action of hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) as a gastroprotective and antinociceptive drug on experimental models.

Materials and methods: HERP was characterized by HPLC/DAD analyses and determination of flavonoids. The biological activity of HERP was evaluated using three antinociceptive models (abdominal contorsion, formalin, glutamate) and also using open field test. In order to assess the gastroprotective activity, four gastric-ulcer models were performed (pyloric ligation, mucus secretion, ethanol and NSAID-induced gastric ulcers).

Results: The sample of HERP presented 21.62 mg/g of formononetin. Acute pretreatment with oral HERP administration caused a significant decrease ($p < 0.001$) in the number of abdominal writhes in all doses (3, 10 and 30 mg/kg). In the formalin test, all HERP doses (3, 10 and 30 mg/kg) also inhibited the late phase (inflammatory pain) of formalin-induced licking ($p < 0.001$), but the inhibition of neurogenic pain was observed by using the highest dose (30 mg/kg). Similar behavior was presented in glutamate-induced model, that presented 74.1% of inhibition at 30 mg/kg ($p < 0.001$). There was no significant difference in *open field* test. Concerning gastroprotective property, HERP showed a decreased ulcerative lesion index at 500 mg/kg using ethanol-induced model. At the same dose, the histologic sections showed that there was a preservation of the gastric epithelium in both models (ethanol and NSAID-induced ulcer). The mucus production was also increased at 500 mg/kg.

Conclusions: We demonstrated that HERP presented activity as antinociceptive and gastroprotective agent and the results point to that these activities were dose-related manner.

Keywords: propolis, analgesics, flavonoids, mucus, stomach ulcer

Glossary

ASA, acetylsalicylic acid; CAPE, caffeic acid; COX, cyclo-oxygenase; HERP, hydroalcoholic extract of red propolis; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; Morph, morphine; NF- κ B, nuclear factor- κ B; NMDA, *N*-methyl-D-aspartate; NO, nitric oxide; NSAID, nonsteroidal anti-inflammatory drug; PG, prostaglandin; ROS, reactive oxidative species; TNF, tumor necrosis factor; TRPA1, transient receptor potential ankyrin 1; TRPV1, transient receptor potential vanilloid 1; ULI, ulcerative lesion index.

1. Introduction

Pain states are related to a series of diseases and tissue injury, and usually appear as a sign of inflammatory conditions. The nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAID) are commonly used to treat pain, but its long term use is closely associated with complications of the gastrointestinal tract, including peptic ulcers (Tielemans et al., 2014). Therefore, new therapies for alleviating pain and avoid side effects such as gastrointestinal disorders are required.

Natural products are, in turn, potential sources for new compounds. For example, propolis is a bee product widely used from early times in folk medicine as an anti-inflammatory and antibacterial medicine (Toreti et al., 2013).

Propolis extracts have received a great interest in medicine and various biological actions have been demonstrated, like antioxidant (Frezza et al., 2013), antinociceptive (Franchin et al., 2012), and anti-inflammatory (Búfalo et al., 2013; Szliszka et al., 2013). These activities are linked to its bioactive compounds and it is noteworthy that propolis from different geographic regions can vary significantly in chemical composition (Piccinelli et al., 2011; Sawaya et al., 2011; López et al., 2014).

In the Northeast region of Brazil, the *Apis mellifera* (Apidae) bees produce red propolis from the botanical origin described as *Dalbergia ecastophyllum*, Fabaceae (Daugusch et al., 2008). It presents new chemical substances (phenolics, triterpenoids, isoflavonoids, prenylated benzophenones, and naphthoquinone epoxide) when compared to other samples (Righi et al., 2011; Morsy et al., 2013). Moreover, important differences in phytochemical markers were found even between kinds of red propolis from distinct origins (López et al., 2014).

Although red propolis extracts and its chemical compounds demonstrated several biological properties, such as healing activity (de Almeida et al., 2013; Albuquerque-Júnior et al., 2009), cytotoxic activity toward tumor cells (Awale et al., 2008), antimicrobial (Righi et al., 2011), and potent antioxidant (Righi et al., 2011; Franchi et al., 2012), the possible antinociceptive and gastroprotective effects were not explored

so far. In this work, we aimed to assess these actions in experimental models of chemical-induced nociception and ulcer as well as gastric secretion and mucus production.

2. Materials and methods

2.1. Drugs and reagents

The following drugs and reagents used were acetylsalicylic acid (ASA), Alcian blue, carbenoxolone, cimetidine, indomethacin, L-glutamic acid hydrochloride, morphine hydrochloride, omeprazole, and quercetine from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). Acetic acid from Merck (Damstadt, Germany). Formalin from Baker (Santo Amaro, SP, Brazil). Haloperidol from Janssen-Cilag Pharmaceuticals (São Paulo, Brazil). All the other reagents used were of analytical grade. All substances used were dissolved in 0.2% Tween 80 in 0.9% NaCl solution, with the exception of indomethacin which was dissolved in 2% sodium bicarbonate.

2.2. Red propolis collection and preparation of the hidroalcoholic extract

Red propolis was collected at Brejo Grande/Sergipe/Brazil (10°28'25"S, 36°26'12"W). The extraction was performed using propolis samples (1 g) and 70% ethanol (12.5 mL) at room temperature for 1 h in an ultrasound bath. After extraction, the mixture was filtered, and the solvent was evaporated to produce the hidroalcoholic extract of red propolis (HERP). The yield of the extraction process was estimated based on the percentage of dry mass obtained, which was calculated with reference to the initial mass of propolis before extraction.

2.3. Sample characterization

2.3.1. High performance liquid chromatography-diode array detection analysis

The quantification of formononetin in the HERP was determined using HPLC analysis. A reverse-phase column C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS (M) 250 x 4.6 mm, 5 µm particle size) with a diode array detector (Shimadzu Co. mod SPC-M20A) was used to chromatography analysis. HERP was homogenized in methanol to a final concentration of 2.5 mg/mL. Ten µL of sample were injected into the HPLC system and the gradient started from 5% of solvent A to 70% during 170 min. The elution was performed at linear gradient using solvent A (0.1% formic acid (v/v) in acetonitrile) and solvent B (0.1% formic acid (v/v) in water). The elution rate was 0.8 mL/min and the detection recorded at 275 nm. The authentic standard of formononetin was used to prepare the standard curve.

2.3.2. Assessment of the flavonoids content

Flavonoids in the HERP were expressed as quercetin equivalent. 0.5 mL of the HERP was mixed with 1.5 mL 95% ethanol (v/v), 0.1 mL 10% aluminum chloride (m/v), 0.1 mL of 1 mol/L potassium acetate, and 2.8 mL water. Volumes of aluminum chloride and potassium acetate were substituted by distilled water in blank. After incubation at room temperature for 40 min, the absorbance of the reaction mixture was measured by spectrophotometry at 415 nm.

2.4. Animals

Young adults Swiss mice (20-30 g) of both sexes obtained from the Central Biotery of the Federal University of Sergipe (São Cristóvão, Brazil) were used in the evaluation of the antinociceptive activity. To evaluate the gastroprotective action, young adults Wistar rats (250-350 g) and Swiss mice (35-45 g), male, were obtained from the Central Biotery of the Tiradentes University (Aracaju, Brazil). Animals were maintained at controlled room temperature ($21 \pm 2^{\circ}\text{C}$) with free access to food (Purina®) and water, under a 12 h light/dark cycle. The experiments were performed after approval of the protocols by the Institutional Ethics Committee (011213 and 250608) and were

carried out in accordance with the current guidelines for the care of laboratory animals. The protocols used in the antinociceptive study were conducted in accordance with the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmermann, 1983).

2.5. Antinociceptive activity

2.5.1. Acetic acid-induced abdominal constriction test

Abdominal writhes were induced by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid (0.6%, 0.1 mL/10 g) in mice (Koster et al., 1959). Animals were pre-treated orally (p.o.) with the HERP (3, 10 or 30 mg/kg), acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg), or vehicle (0.2% Tween 80, 0.1 mL/10 g) 60 min before initiating the algescic stimulation ($n = 6/\text{group}$). The abdominal writhes were observed for a period of 20 min and began 5 min after the injection of the nociceptive agent.

2.5.2. Formalin-induced paw licking test

Mice were pre-treated with the HERP (3, 10 or 30 mg/kg, p.o., 60 min before), morphine (3 mg/kg, i.p., 30 min before), ASA (300 mg/kg, p.o., 60 min before), or vehicle (0.2% Tween 80, p.o., 60 min before). An intraplantar injection of 2% formalin solution (20 μL) was given to the right hindpaw of the animal ($n = 6/\text{group}$). The time that the animal spent licking or biting its paw was measured during the first phase (0-5 min) and the second-phase (15-30 min) of the test (Hunskar and Hole, 1987).

2.5.3. Glutamate-induced nociception

Mice ($n = 6/\text{group}$) were treated with the HERP (3, 10 or 30 mg/kg, p.o., 60 min before), morphine (3 mg/kg, i.p., 30 min before), or vehicle (0.2% Tween 80, p.o., 60 min before). After, a volume of 20 μL of glutamate (20 $\mu\text{mol}/\text{paw}$) was injected intraplantarly in the ventral surface of the right hind paw. Animals were observed

individually for 15 min after glutamate injection. The amount of time spent licking the injected paw was recorded with a chronometer and was considered as indicative of nociception (Beirith et al., 2002).

2.5.4. The open field test

The open-field test was performed in order to evaluate the motor and emotional states (Prut and Belzung, 2003). Mice ($n = 5/\text{group}$) were orally treated with the HERP (50 mg/kg) or vehicle 30 min before being introduced to the open field apparatus. The haloperidol (0.2 mg/kg) was given intraperitoneally (i.p.). The equipment was made of white colored wood, and it consisted of a quadrilateral with a rectangular area of 4,830.25 cm² and walls that were 34.5 cm high, with the base subdivided into sixteen quadrants (O'Leary et al., 2013). The parameters evaluated during 5 min were: (i) locomotion or crossings (number of line crosses), (ii) rearings (the number of times the mouse stands on its hind legs), and (iii) grooming (the number of times the mouse "washes" itself by licking during the observation period) (Whimbey and Denenberg, 1967).

2.6. Gastroprotective activity

2.6.1. Ethanol-induced ulcer

The experiment was carried out according to the method of Robert et al. (1979). After 24 h of fasting, the rats ($n = 6/\text{group}$) were treated orally with the HERP (50, 250 or 500 mg/kg), omeprazole (100 mg/kg), or vehicle (0.2% Tween 80, 10 mL/kg). Thirty minutes after treatment, all the rats received 1 mL of absolute ethanol to induce gastric ulcer. One hour later, the animals were anesthetized and euthanized in CO₂ chamber, and the stomachs were removed and opened along the greater curvature. The stomachs were gently rinsed with water to remove the gastric contents and blood clots, for subsequent scanning. The images obtained were analyzed using Image J software. The ulcers were classified as: level I, ulcer area < 1 mm²; level II, ulcer area 1-3 mm²;

and level III, ulcer area $> 3 \text{ mm}^2$. The following parameters were determined: (i) ulcerative lesion index (ULI) as $1 \times (\text{number of ulcers level I}) + 2 \times (\text{number of ulcers level II}) + 3 \times (\text{number of ulcers level III})$; (ii) curative ratio, which was determined as follows: $\%C = 100 - (\text{ULI treated} \times 100/\text{ULI vehicle})$; and (iii) percentage of lesion area in relation to total stomach area (Barros et al., 2007).

For the histological analysis, the stomach samples were fixed in 10% formalin and embedded in paraffin. Serial sections of $5 \mu\text{m}$ thick were performed and stained in hematoxylin-eosin. The sections were assessed by an experienced pathologist without the knowledge of the treatments ($n = 6/\text{group}$).

2.6.2. NSAID-induced ulcer

The experiment was carried out according to the method of Morimoto et al. (1991) with a few modifications. After 24 h of fasting, the mice ($n = 6/\text{group}$) were pre-treated orally with the HERP (50, 250 or 500 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg), or vehicle (0.2% Tween 80). Thirty minutes after pre-treatment, all the mice received indomethacin (60 mg/kg, s.c.) to induce gastric ulcer. Six hours after treatment with indomethacin, the animals were anesthetized and euthanized in CO_2 chamber. The stomachs were removed, opened along the greater curvature, and gently rinsed with water, for subsequent scanning. The obtained images were analyzed using the parameters previously described (section 2.6.1.).

For the histological analysis, the specimens were processed as described in section 2.6.1. ($n = 6/\text{group}$).

2.6.3. Determination of the gastric juice parameters - pyloric ligation

The assay was performed using the method of Shay et al. (1945) with a few modifications. After 36 h of fasting, the animals were anesthetized with ketamine/xilazine (7.5 and 60 mg/kg, respectively, i.p.), the abdomen was incised and the pylorus ligated. Immediately after pylorus ligation, the rats ($n = 6/\text{group}$) were pre-

treated intraduodenally with the HERP (50, 250 or 500 mg/kg), cimetidine (100 mg/kg), or vehicle (0.2% Tween 80). Four hours later, the animals were anesthetized and euthanized in CO₂ chamber; the abdomen was opened, and another ligature placed at the esophageal end. The stomachs were removed and the gastric contents collected and centrifuged at 8,000×g (25°C, 10 min). The volume of gastric juice acid secreted (mL) and the pH values were determined. The total acid secretion in the gastric juice in the supernatant volume was determined by titration using a 0.01 N NaOH standard solution, and phenolphthalein as indicator.

2.6.4. Determination of mucus in gastric content

This assay was performed according to the methodology described previously by Sun et al. (1991) with a few modifications. After 36 h of fasting, the animals were anesthetized with ketamine/xilazine (7.5 and 60 mg/kg, respectively, i.p.), the abdomen was incised and the pylorus ligated. Immediately after pylorus ligation, the rats ($n = 6$ /group) were pre-treated intraduodenally with the HERP (50, 250 and 500 mg/kg), carbenoxolone (200 mg/kg), or vehicle (0.2% Tween 80). The animals were anesthetized and euthanized in CO₂ chamber 4 h after the drug treatments. The stomach content was immersed in 10 mL of 0.02% Alcian blue, 0.16 M sucrose, 0.05 M sodium acetate solution, pH 5.8, and incubated for 24 h at 20°C. The Alcian blue binding extract was centrifuged at 3,000×g for 10 min. The absorbance of the supernatant was measured by spectrophotometry at 620 nm. The free mucus in the gastric content was calculated from the amount of Alcian blue binding (mg/g tissue).

2.7. Statistical analysis

The results are presented as the means $\pm$ SEM of n animals per group. Statistical evaluation of the data was performed using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni's test. Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant.

3. Results

3.1. Sample characterization

The yield of HERP extraction was 33.9% (w/w). Figure 1 shows the chromatograms of formononetin, used as standard, (A) and the HERP (B). Under the chromatographic conditions employed, formononetin eluted with a retention time of approximately 85.5 min (Fig. 1). The content of formononetin observed in the HERP was 21.62 mg/g.

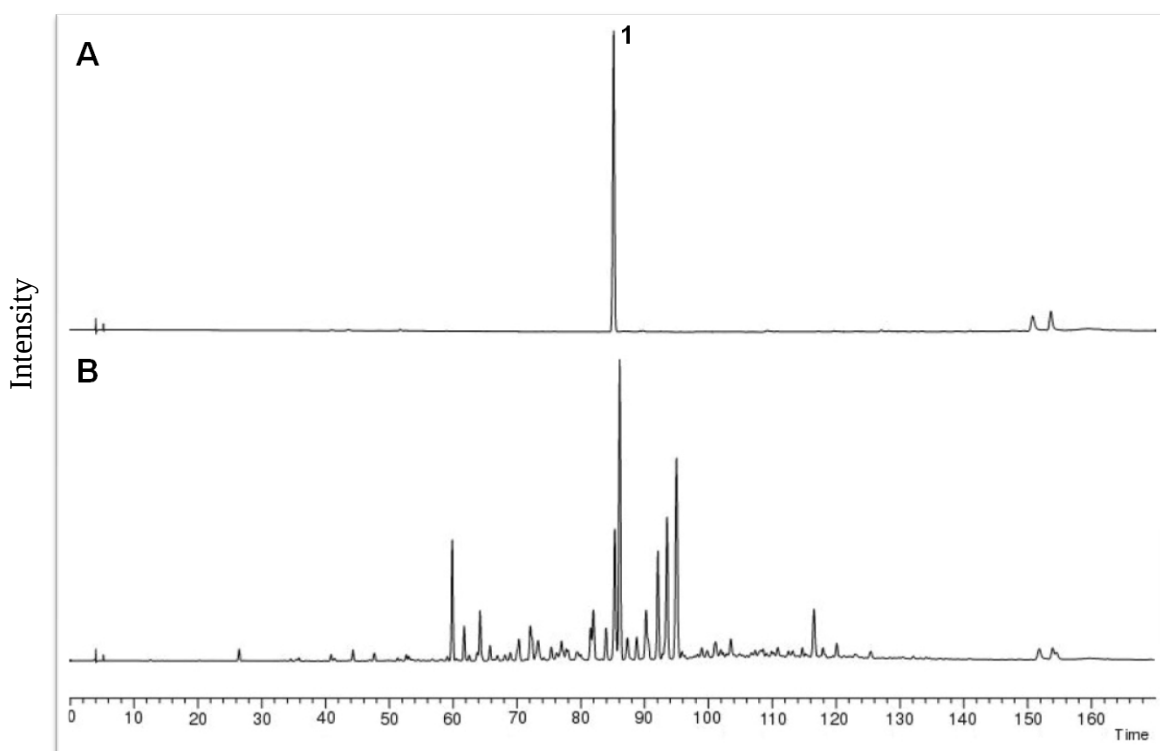


Figure 1

Figure 1. (A) Representative chromatogram of formononetin standard (peak 1; R_t = 85.5 min); (B) Representative chromatogram of the dry extract of red propolis. The chromatographic conditions used were: column C18 Shim-Pack CLC-ODS, the mobile-phase consisting of formic acid 0.1% (v/v) in acetonitrile (solvent A) and formic acid 0.1% (v/v) in water (solvent B), flow rate of 0.8 mL/min, and detection at 275 nm; R_t - retention time.

On the basis of quercetin calibration curve, the concentration of flavonoids quercetin-equivalent in the HERP was 1.7%.

3.2. Antinociceptive activity

The writhes evoked by injection of acetic acid were markedly reduced, dose-related manner, by the pre-treatment with the HERP at 3, 10, and 30 mg/kg (46.6, 73.7, and 88.9%, respectively, $P < 0.001$; Fig. 2). ASA (300 mg/kg) also significant inhibited (83.7%, $P < 0.001$) the writhes induced by acetic acid (Fig. 2).

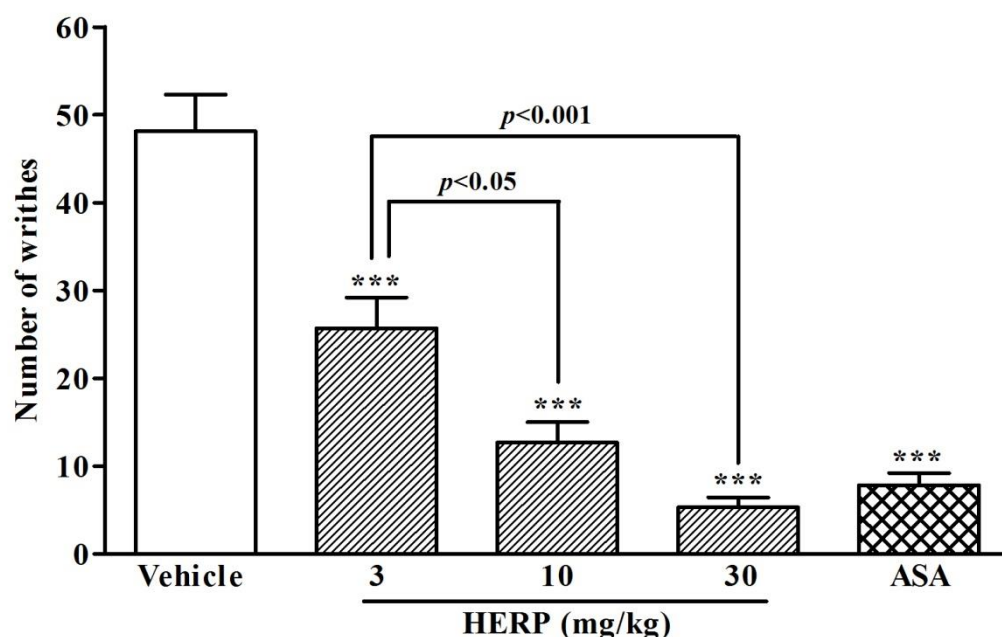


Figure 2. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on acetic acid-induced visceral nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3, 10 or 30 mg/kg), or acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg) before of acetic acid injection. The results are presented as the means $\pm$ SEM ($n = 6$ /group). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** $P < 0.001$ vs. the vehicle group.

The intraplantar injection of the formalin solution produced nociceptive behavior in both the first and second phases (72.0 ± 3.8 and 95.4 ± 8.2 s, respectively; Fig. 3). The HERP produced marked inhibition of formalin-induced neurogenic (61.0% at 30 mg/kg, $P < 0.001$) and inflammatory (77.2, 78.5, and 83.7% at 3, 10, and 30 mg/kg, respectively, $P < 0.001$) phases (Fig. 3). Similarly, morphine (3 mg/kg) caused significant inhibition of 62.1 and 91.4% of formalin-induced nociceptive behavior in the first and second phases, respectively ($P < 0.001$; Fig. 3). ASA (300 mg/kg) caused

inhibition of 82.0% in the second phase of formalin-induced nociception ($P < 0.001$; Fig. 3).

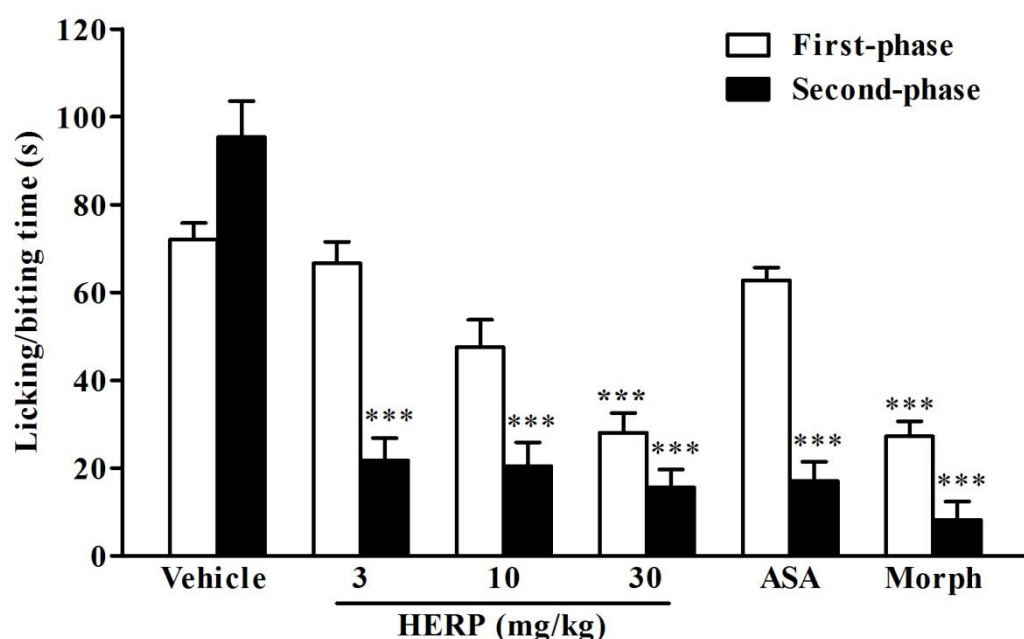


Figure 3. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on formalin induced nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3, 10 or 30 mg/kg), acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg), or morphine (Morph, 3 mg/kg) before a formalin injection. The results are presented as the means $\pm$ SEM ($n = 6$ /group). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** $P < 0.001$ vs. the respective vehicle group.

The oral administration of HERP produced attenuation of the glutamate-induced nociception at 30 mg/kg (74.1%, $P < 0.001$; Fig. 4). Morphine (3 mg/kg) also inhibited (75.9%, $P < 0.001$) the nociception induced by glutamate (Fig. 4).

The treatment with the HERP (50 mg/kg) failed to significantly change all parameters evaluated on the motor and emotional states, compared with the vehicle group. On the other hand, haloperidol (0.2 mg/Kg) decreased crossing ($P < 0.001$), rearing ($P < 0.01$), and grooming ($P < 0.05$; Table 1).

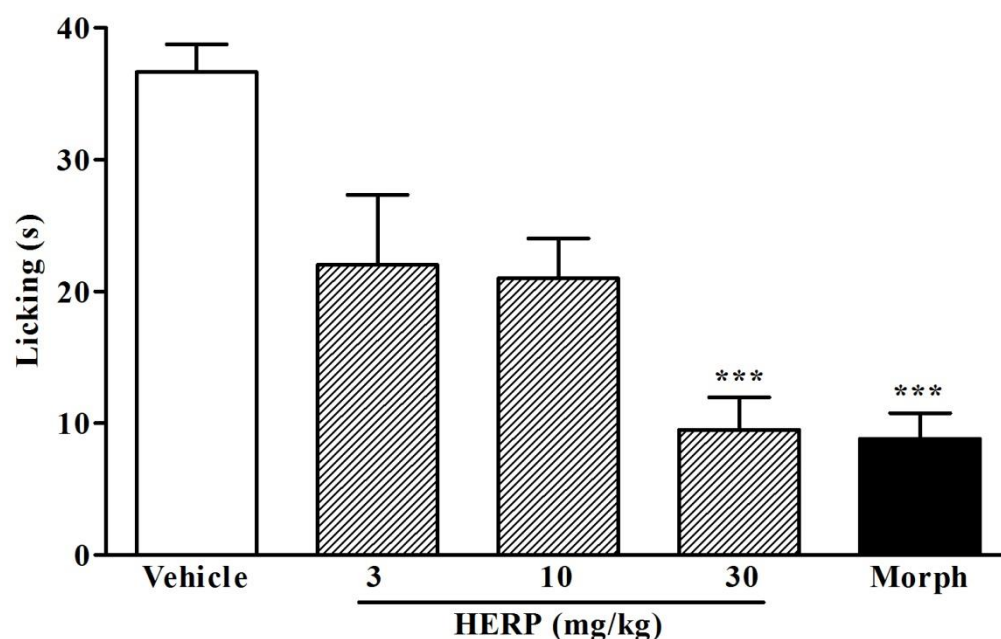


Figure 4. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on glutamate-induced nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3, 10 or 30 mg/kg), or morphine (Morph, 3 mg/kg) before a glutamate injection. The results are presented as the means $\pm$ SEM ($n = 6$ /group). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** $P < 0.001$ vs. the vehicle group.

Table 1. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on the motor and emotional states in mice.

Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	Crossing	Rearing	Grooming
Vehicle (p.o.)	-	133.20 $\pm$ 8.69	31.80 $\pm$ 6.89	3.80 $\pm$ 1.32
Haloperidol (i.p.)	0.2 mg/Kg	75.50 $\pm$ 4.25***	10.75 $\pm$ 4.78**	1.26 $\pm$ 0.25*
HERP (p.o.)	50	144.80 $\pm$ 6.81	33.80 $\pm$ 2.89	4.00 $\pm$ 1.14

Results as mean $\pm$ SEM ($n = 5$ /group). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Bonferroni's test. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ vs. vehicle group.

3.3. Gastroprotective activity

In the ethanol-induced ulcer model, the treatment with the HERP (500 mg/kg) produced inhibition on the ulcerative lesion index and the percentage of lesion area, compared with the vehicle group ($P < 0.05$; Table 2). Omeprazole (100 mg/kg) significantly also reduced the gastric ulcer parameters ($P < 0.01$; Table 2).

Results of histopathological analysis of the gastric mucosa after absolute ethanol administration are shown in Fig. 5. The administration of absolute ethanol (vehicle group) induced consistent microscopic damage, which was characterized by disruption of the superficial region of the gastric gland with loss of epithelial cells, pronounced edema of the submucosa, degradation of the mucosa, and infiltration of inflammatory cells. Animals pre-treated with the HERP (250 and 500 mg/kg, p.o.) showed less mucosal damage when compared with the vehicle group (Fig. 5). Pre-treatment with omeprazole also inhibited lesions promoted by absolute ethanol (vehicle group; Fig. 5).

Table 2. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on ethanol-induced ulcers in rats.

Treatment (p.o.)	Dose (mg/kg)	Lesion area (%)	Ulcerative lesion index	Curative ratio (%)
Vehicle	-	7.16 ± 1.23	16.00 ± 0.82	-
Omeprazole	100	0.33 ± 0.23***	2.00 ± 1.23**	87.50
HERP	50	5.25 ± 1.15 [#]	14.00 ± 3.67	12.50
	250	5.24 ± 0.80 [#]	18.00 ± 1.23	-
	500	1.30 ± 0.63***	5.00 ± 2.45*	68.75

Results as mean ± SEM (*n* = 6/group). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Bonferroni's test. **P* < 0.05, ***P* < 0.01, and ****P* < 0.001 vs. vehicle group; [#]*P* < 0.05 vs. HERP group at 500 mg/kg.

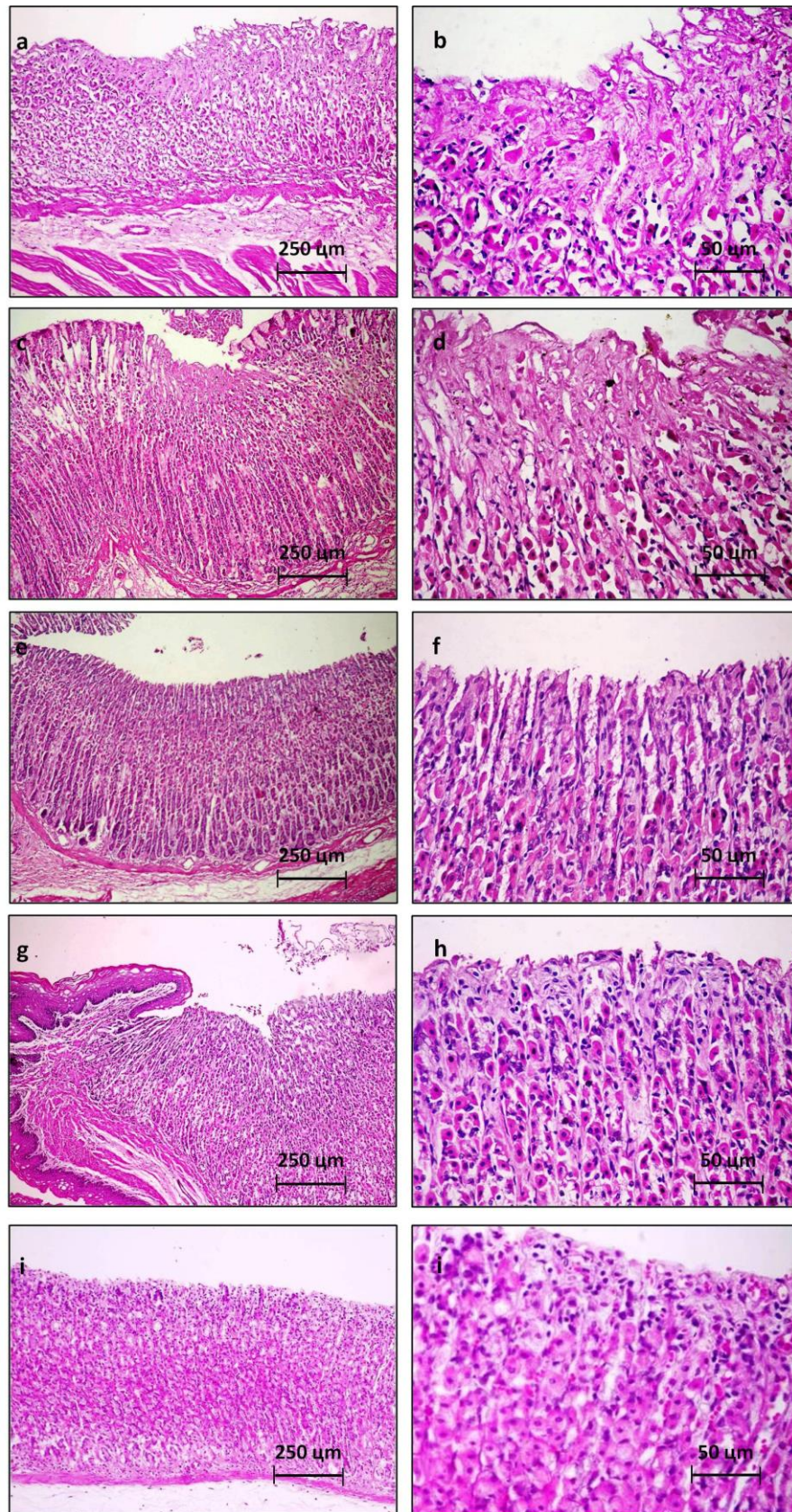


Figure 5. HE-stained histological sections of the gastric mucosa specimens in the ethanol-induced ulcer model ($n = 6/\text{group}$). (a-b) Vehicle group; (c-d) HERP group at 50 mg/kg; (e-f) HERP group at 250 mg/kg; (g-h) HERP group at 500 mg/kg; and (i-j) Omeprazole group. HERP, hydroalcoholic extract of red propolis.

In this study we did not detect macroscopic gastric lesions induced by indomethacin in mice, and therefore, not been possible to calculate the ulcerative lesion index.

In the model of evaluation of gastric secretion, using ligature pylorus, the treatment with the HERP significantly reduced the secretion volume (50 and 250 mg/kg, $P < 0.01$) and total acid secretion (50 mg/kg, $P < 0.01$) (Table 3). The HERP failed to significantly increase the pH value, compared with the vehicle group. However, cimetidine significantly changed all the gastric juice parameters ($P < 0.01$, Table 3).

Table 3. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP), administered intraduodenally, on the biochemical parameters of gastric juice obtained from pylorus ligature in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	Volume (mL)	pH	[H ⁺]mEq/L/4 h
Vehicle	-	1.20 ± 0.04	3.40 ± 0.20	46.8 ± 2.61
Cimetidine	100	0.80 ± 0.04**	6.10 ± 0.45***	27.5 ± 3.14**
HERP	50	0.70 ± 0.08***	3.40 ± 0.12	65.9 ± 2.69**###
	250	0.80 ± 0.08**	3.40 ± 0.12	56.0 ± 3.35##
	500	1.00 ± 0.08	3.30 ± 0.00	36.3 ± 3.55

Results as mean ± SEM ($n = 6$ /group). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Bonferroni's test. ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ vs. vehicle group; ## $P < 0.01$ and ### $P < 0.001$ vs. HERP group at 500 mg/kg.

In the mucus determination model, after treatment with the HERP (500 mg/kg), there was a significant increase ($P < 0.01$) in mucus production, compared with the group treated with vehicle (Table 4). Carbenoxolone (200 mg/kg) also increased the mucus production ($P < 0.001$; Table 4).

Table 4. The effect of the hidroalcoholic extract of red propolis (HERP), administered intraduodenally, on Alcian blue binding to free gastric mucus from pylorus ligation in rats.

Treatment	Dose (mg/kg)	Alcian blue bound (mg/g tissue)
Vehicle	-	1.15 ± 0.03
Carbenoxolone	200	1.53 ± 0.03***
HERP	50	1.21 ± 0.02
	250	1.25 ± 0.02
	500	1.28 ± 0.03**

Results as mean ± SEM (*n* = 6/group). Statistical comparison was performed using ANOVA followed by the Bonferroni's test. ***P* < 0.01 and ****P* < 0.001 vs. vehicle group.

4. Discussion

The chemical composition of red propolis has been assigned different from the others varieties found around the world (López et al., 2014). We identified and quantified formononetin, an isoflavonoid already described in red Brazilian propolis (Daugusch et al., 2008; López et al., 2014) as one of the major compounds in red propolis, but not found in others varieties. We demonstrated that the HERP extract, formononetin-rich, was capable to show antinociceptive and gastroprotective effects in animal models.

In the present work, the antinociceptive activity of the HERP was evaluated using chemical stimuli to assess the central and/or peripheral action of the extract.

The acetic acid-induced abdominal constriction test is considered a model of visceral pain (Collier et al., 1968) and was used to evaluate the peripheral antinociceptive activity of the HERP. In this model, the pain is generated indirectly via endogenous mediators (Serhan and Haeggström, 2010) as histamine, bradykinin, serotonin, prostaglandins (Duarte et al., 1988), and cytokines [tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-8] by residential macrophages and mast cells (Ribeiro et al., 2000). These mediators are capable of increasing vascular permeability, reduce the

threshold of nociception, and stimulate the nerve endings of primary afferent nociceptive fibers (Martinez et al., 1999), through activation of ion channels sensitive to acids and the also the transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) cation channels (Ykeda et al., 2001; Premkumar and Abooj, 2013).

The HERP reduced the writhes in a dose dependent manner. It suggests that the HERP can decrease inflammatory response. Other studies support this hypothesis, since they confirmed an anti-inflammatory activity of different propolis samples and their main compounds. For example, pharmacological evaluation of Cuban red propolis (Ledón et al., 1997), Brazilian green propolis (Paulino et al., 2006), and Bulgarian propolis (Paulino et al., 2003) presented anti-inflammatory activity, which is mediated by prostaglandin (PG)E₂ and nitric oxide (NO) inhibition (Paulino et al., 2008). The chemical analysis showed that the HERP contains considerable amounts of flavonoids. These compounds possess antinociceptive and anti-inflammatory activities: they inhibit lipooxygenases and cyclo-oxygenase (COX)-2, histamine, phospholipases, glutathione S-transferase, and NADPH-oxygenase; suppress the activation of the nuclear factor- κ B (NF- κ B) transcription (Rathee et al., 2009; Zhang et al., 2012); and may be responsible for antinociceptive activity by modulating the expression of pro-inflammatory genes such as COX-2 and inducible nitric oxide synthase (iNOS) (Righi et al., 2013).

It was also shown that important constituents of the HERP, daidzein, quercetin, and kampferol (Alencar et al., 2007; Dausch et al., 2008) reduce the formation of NO in response to inflammatory stimuli (Hämäläinen et al., 2007). In addition, the acids phenolic substances present in the HERP (Alencar et al., 2007; Righi et al., 2011) could be able to antagonize the nociceptive action of acetic acid in the acid-sensitive ion channels.

The formalin-induced paw licking test was used to evaluate the both neurogenic (nociceptive) and inflammatory pain responses. Two phases comprise this test: the first is caused by activation of nociceptor ion channel transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (McNamara et al., 2007), while the second is mediated by a combination of

peripheral input and sensitization of neurons spinal cord (Hunnskaar and Hole, 1987). Moreover, whereas the writhing test is sensitive to several drugs with both peripheral and central actions (Loux et al., 1978), in the formalin test the drugs with central action block both phases while peripherally acting drugs, such as NSAIDs, cause inhibition in the second stage only (Shibata et al., 1989).

Both the HERP (30 mg/kg) and morphine (3 mg/kg) decreased the response of the first and second stages, while ASA decreased the second. These data are consistent with the previous reports (Malmberg and Yaksh, 1992) and indicate that the HERP acts in both the central and peripheral nociception. Also, it corroborates that this extract and/or its bioactive compounds possess anti-inflammatory activity.

Regarding the anti-inflammatory action, in the chemical analysis it was observed a major chromatographic peak in the HPLC identified as formononetin. This finding is consistent with previous work (Daugusch et al., 2008; Righi et al., 2011). It was shown that formononetin exhibits anti-inflammatory activity, being able to reduce the action of IL-1 β and NF- κ B *in vitro* (Wang et al., 2012). Moreover, anti-inflammatory and antioxidant activities of formononetin promoted neuron and lung protective effects *in vivo*, by means of decrease the TNF- α and IL-6 (Li et al., 2014), and improved superoxidase dismutase activity (Ma et al., 2013). Thus, it can be proposed that the antinociceptive action of the HERP may be mediated, at least in part, by formononetin.

While the influence of the HERP in the second phase may be explained by anti-inflammatory actions, the nociceptive response remains to be elucidated. We evaluated the possible influence of the HERP in the nociceptive transmission mediated by glutamate. It is the major excitatory neurotransmitter in the central nervous system and is involved in the primary afferent nociceptive transmission, in both the initiation and maintenance of the response (Beirith et al., 2002). Moreover, several studies have shown that glutamate is important for the spinal and supraspinal transmissions (Fundytus, 2001), as well as the spinal TRPA1 participation in the enhancement of glutamatergic nociceptive response (Klafke et al., 2012).

In this study, we observed that the HERP produced an antinociceptive effect on the glutamate induced paw licking response. The action of glutamate involves metabotropic and ionotropic receptors [*N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA] and depends on the activation of the L-arginine/NO pathway (Beirith et al., 2002). The NO and other reactive oxygen species (ROS) have been implicated in tissue damage and inflammatory and nociceptive responses (Heine et al., 2011). Also, ROS enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels (Nishio et al., 2013). Whereas the HERP and its chemical markers (flavonoids, acids, pigments) may be able to scavenge NO and thus attenuate the inflammatory and nociceptive processes, the effects described for the HERP here may also be attributed to its antioxidant activity (Righi et al., 2011; Frozza et al., 2013).

Although a higher dose was required for the HERP (30 mg/kg) to show similar effects to morphine dose (3 mg/kg) in the formalin (first phase) and glutamate tests, the HERP produced no adverse effects on the motor and emotional states of the animals, as seen in open field test. It can represent an advantage with respect to opioids for the treatment of neuropathic pain. In addition, the writhing test is considered to be more sensitive because it can detect the antinociceptive effect at doses lower than those required in other tests (Bentley et al., 1983). This is due to the direct interaction of compounds with peripheral receptors in the peritoneal cavity (Bentley et al., 1981). So, taken together, results indicate that the HERP presents central and peripheral antinociceptive action and it is quite effectively.

We also evaluated the possible acute gastroprotective effects of the HERP against the ulcers induced by ethanol and indomethacin, and the gastric secretion and mucus production after the pylorus ligation. Oral administration of the HERP presented antiulcer action even at higher doses. It decreased the ulcerative lesion index and the percentage of lesion area induced by absolute ethanol (500 mg/kg), and reduced microscopic damage to the mucosa promoted by ethanol (250-500 mg/kg). Also, the

HERP reduced the gastric volume (50-250 mg/kg) and increased the mucus production (500 mg/kg) in pylorus ligation model.

Ethanol experimentally used to induce ulcers in rodents leads to gastric mucosal injury through direct and indirect effects of ROS and cytokines (Abdel-Salam et al., 2001). This process seems to be mediated by activation of neutrophils and results in cellular lipid and protein peroxidation (Rocha et al., 2011). Nevertheless, several studies showed that natural products with antioxidant activity protect the gastric mucosa (Khan et al., 2013; Ribeiro et al., 2013; Rozza et al., 2013; Sánchez-Mendoza et al., 2013). As discussed before, compounds from the HERP possess antioxidant and anti-inflammatory actions. For example, neovestiol and vestiol isoflavones isolated from Brazilian propolis were able to inhibit the neutrophil migration into the peritoneal cavity (Bueno-Silva et al., 2013).

Propolis extracts from different origins like green propolis (Barros et al., 2007) and its main compounds have been shown to present gastroprotective activity. Caffeic (CAPE), ferulic, p-coumaric, and cinnamic acids displayed antiulcer activity against ethanol and indomethacin (Barros et al., 2008), and these compounds are also present in the HERP (Daugusch et al., 2008; Righi et al., 2011).

The integrity of the gastric mucosa requires the release of PGE₂. It induces the production of mucus that protects of necrotizing agents and this process seems to be modulated by NO (Khattab et al., 2001). Anti-inflammatory drugs, such as indomethacin, cause lesions in the gastrointestinal tract mostly through the suppression of the PGE₂ synthesis and COX inhibition (Sánchez-Mendoza et al., 2011). In the model used in this study, indomethacin produced only microscopic changes in the gastric mucosa. Even so, it was possible to observe that the HERP promoted preservation of the gastric epithelium and cimetidine prevented epithelial injuries and promoted the submucosa integrity. A similar result was observed for Egyptian propolis, which showed gastroprotective activity against indomethacin, by increasing the production of PGE₂ and mucus, and decreased of TNF- α and IL-1 β

release (El-Ghazaly et al., 2011). The pro-inflammatory cytokine TNF- α is an important determinant of the severity of gastric ulcers (Salga et al., 2012) since it can enhance the effects of oxidative stress (Wassmann et al., 2004). Formononetin and the above mentioned flavonoids from the HERP are able to decrease TNF- α and IL-1 β release in injured tissues (Wang et al., 2012; Li et al., 2014) and therefore can be related to the protective effect against mucosal damage observed in the microscopic analysis.

Histological analysis also showed moderate lymphocytic infiltrate in both models, and it was attenuated by the HERP, suggesting an immunomodulatory role in the cytokines release. It was shown that bioactive fraction of geopropolis from the same region decreased neutrophil migration and the interaction of leukocytes with endothelial cells in inflammatory conditions, whose mechanism involves NO (Franchin et al., 2013). Other studies demonstrated that propolis enhance the immune response (Freitas et al., 2011; Mossalayi et al., 2013; Mise Yonar et al., 2014).

In agreement, the analysis of the gastric contents showed an increase in the mucus production. According to some studies, flavonoids can increase the mucus and bicarbonate production and also act on the proton pump in the parietal cells (Gracioso et al., 2002). Although the HERP induced an increase in the concentration of H⁺, probably because of the presence of acid phenolic compounds, it did not result in significant changes in the pH. The results differ from cimetidine, suggesting a distinct mechanism of action.

On the other hand, the HERP decreased the gastric secretion volume after pylorus ligation. The mechanism of volume increase in this model depends of vagal acetylcholine release and cholinergic action on the parietal and G cells (Tebbe et al., 2003). There is evidence that CAPE increases gastric acid secretion stimulated by an acetylcholine agonist receptor and through inhibition of acetylcholinesterase activity (Borrelli et al., 2005). CAPE is not the major compound identified in red propolis, but flavonoids in the HERP could secondarily increase prostaglandin production and gastric secretion via mast cells (Brzozowski et al., 2005).

Taken together, results showed gastroprotective actions of the HERP. They can be attributed to the anti-inflammatory, immunomodulatory, and antioxidant actions of the HERP and is noteworthy that most of these actions involve the NO system. It could represent, therefore, an alternative medicine to treat ulcers, which reduces gastric secretion and at the same time provide antioxidant and anti-inflammatory activities.

5. Conclusion

The HERP presented effective antinociceptive activity and also a gastroprotective effect against different ulcer models. Although further studies are needed to clarify the mechanism of action of the HERP, this may be related to its antioxidant and anti-inflammatory properties. The results confirm the folk use propolis, even containing different chemical composition, and point to a new therapeutic strategy for relief of pain and gastrointestinal disorders.

Acknowledgements

SMT is recipient of CNPq productivity grants. RLC received scholarship from FAPITEC. This work was supported by FAPITEC/SE (Government Foundation to Research Development of Sergipe State).

References

- Abdel-Salam, O.M.E., Czimmer, J., Debreceni, A., Szolcsanyi, J., Mozsik, G. 2001. Gastric mucosal integrity: gastric mucosal blood flow and microcirculation. Anoverview. J Physiol Paris. 95, 105–127.
- Alencar, S.M., Oldoni, T.L.C., Castro, M.L., Cabral, I.S.R., Costa-Neto, C.M., Cury, J.A., Rosalen, P.L., Ikegaki, M., 2007. Chemical composition and biological activity

- of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 113, 278-283.
- Awale, S., Li, F., Onozuka, H., Esumi, H., Tezuka, Y., Kadota, S., 2008. Constituents of Brazilian red propolis and their preferential cytotoxic activity against human pancreatic PANC-1 cancer cell line in nutrient-deprived condition. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 16, 181-189.
- Barros, M.P., Lemos, M., Maistro, E.L., Leite, M.F., Sousa, J.P., Bastos, J.K., Andrade, S.F. 2008. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 8, 372-377. doi: 10.1016/j.jep.2008.09.015.
- Barros, M.P., Sousa, J.P.B.S., Bastos, J.K., Andrade, S.F., 2007. Effect of Brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 567-571.
- Beirith, A., Santos, A.R.S., Calixto, J.B., 2002. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain research*. 924, 219-228.
- Bentley, G.A., Newton, S.H., Starr, J. 1981. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. *Br J Pharmacol*. 73, 325-332.
- Bentley, G.A., Newton, S.H., Starr, J. 1983. Studies on the antinociceptive action of alpha-agonist drugs and their interactions with opioid mechanisms. *Br J Pharmacol*. 79, 125-134.
- Borrelli, F., Posadas, I., Capasso, R., Aviello, G., Ascione, V., Capasso, F. 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on gastric acid secretion in vitro. *Eur J Pharmacol*. 521, 139-143.
- Brzozowski, T., Konturek, P.C., Konturek, S.J., Brzozowska, I., Pawlik, T. 2005. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. *J Physiol Pharmacol*. 56, Suppl 5, 33-55.

- Bueno-Silva, B., Alencar, S.M., Koo, H., Ikegaki, M., Silva, G.V., Napimoga, M.H., Rosalen, P.L. 2013. Anti-inflammatory and antimicrobial evaluation of neovestitol and vestitol isolated from Brazilian red propolis. *J Agric Food Chem.* 60,14546-14550.
- Búfalo, M.C., Ferreira, I., Costa, G., Francisco, V., Liberal, J., Cruz, M.T., Lopes, M.C., Batista, M.T., Sforcin, J.M., 2013. Propolis and its constituent caffeic acid suppress LPS-stimulated pro-inflammatory response by blocking NF- κ B and MAPK activation in macrophages. *Journal of Ethnopharmacology.* 149, 84-92.
- Collier, H.O., Kinneen, L.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology.* 32, 295-310.
- Daugusch, A., Moraes, C.S., Fort, P., Park, Y.K. 2008. Brazilian red propolis-chemical composition and botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med.* 5, 435-441. doi:10.1093/ecam/nem057.
- de Almeida, E.B., Cordeiro Cardoso, J., Karla de Lima, A., de Oliveira, N.L., de Pontes-Filho, N.T., Oliveira Lima, S., Leal Souza, I.C., de Albuquerque-Júnior, R.L. 2013. The incorporation of Brazilian propolis into collagen-based dressing films improves dermal burn healing. *J Ethnopharmacol.* 147, 419-425.
- Duarte, I.D., Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 21, 341-343.
- El-Ghazaly, M.A., Rashed, R.R., Khayyal, M.T. 2011. Anti-ulcerogenic effect of aqueous propolis extract and the influence of radiation exposure. *Int J Radiat Biol.* 87, 1045-1051. doi: 10.3109/09553002.2011.602378.
- Franchi, G.C. Jr., Moraes, C.S., Toret, V.C., Daugsch, A., Nowill, A.E., Park, Y.K. 2012. Comparison of effects of the ethanolic extracts of brazilian propolis on human leukemic cells as assessed with the MTT assay. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2012, 918956.

- Franchin, M., da Cunha, M.G., Denny, C., Napimoga, M.H., Cunha, T.M., Koo, H., de Alencar, S.M., Ikegaki, M., Rosalen, P.L., 2012. Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 β and TNF- α . *Journal of Ethnopharmacology*. 143, 709-715.
- Franchin, M., da Cunha, M.G., Denny, C., Napimoga, M.H., Cunha, T.M., Bueno-Silva, B., Matias de Alencar, S., Ikegaki, M., Luiz Rosalen, P. 2013. Bioactive Fraction of Geopropolis from *Melipona scutellaris* Decreases Neutrophils Migration in the Inflammatory Process: Involvement of Nitric Oxide Pathway. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013, 907041. doi: 10.1155/2013/907041.
- Freitas, J.A., Vanat, N., Pinheiro, J.W., Balarin, M.R., Sforcin, J.M., Venancio, E.J. 2011. The effects of propolis on antibody production by laying hens. *Poult Science*. 90, 1227-1233. doi: 10.3382/ps.2010-01315.
- Frozza, C.O., Garcia, C.S., Gambato, G., de Souza, M.D., Salvador, M., Moura, S., Padilha, F.F., Seixas, F.K., Collares, T., Borsuk, S., Dellagostin, O.A., Henriques, J.A., Roesch-Ely, M., 2013. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food and Chemical Toxicology*. 52, 137-142.
- Fundytus, M.E., 2001. Glutamate receptors and nociception: implications for the drug treatment of pain. *CNS Drugs*. 15, 29-58.
- Gracioso, J. S., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Souza Brito, A.R. 2002. Effects of tea from *Turnera ulmifolia* L. on mouse gastric mucosa support the Turneraceae as a new source of antiulcerogenic drugs. *Biol Pharm Bull*. 25, 487-491.
- Hämäläinen, M., Nieminen, R., Vuorela, P., Heinonem, M., Moilanen, E., 2007. Anti-Inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit stat-1 and nf-kb activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only nf-kb activation along with their inhibitory effect on inos expression and no production in activated macro-phages. *Mediators Inflamm*. 2007, 45673. doi: 10.1155/2007/45673.

- Heine, S., Michalakakis, S., Kallenborn-Gerhardt, W., Lu, R., Lim, H.Y., Weiland, J., Del Turco, D., Deller, T., Tegeder, I., Biel, M., Geisslinger, G., Schmidtko, A. 2011. CNGA3: a target of spinal nitric oxide/cGMP signaling and modulator of inflammatory pain hypersensitivity. *J Neuroscience*. 31, 11184-11192. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6159-10.2011.
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 30, 103-114.
- Khattab, M.M., Gad, M.Z., Abdallah, D. 2001. Protective role of nitric oxide in indomethacin induced gastric ulceration by a mechanism independent of gastric acid secretion. *Pharmacol Res*. 43, 463-467.
- Klafke, J.Z., da Silva, M.A., Trevisan, G., Rossato, M.F., da Silva, C.R., Guerra, G.P., Villarinho, J.G., Rigo, F.K., Dalmolin, G.D., Gomez, M.V., Rubin, M.A., Ferreira, J. 2012. Involvement of the glutamatergic system in the nociception induced intrathecally for a TRPA1 agonist in rats. *Neuroscience*. 222, 136-146. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.07.022.
- Koster, R., Anderson, N., Debber, E.J., 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Federation proceedings*. 18, 418-420.
- Ledón, N., Casaco, A., Gonzalez, R., Merino, N., Gonzalez, A., Tolon, Z. 1997. Antipsoriatic, anti-inflammatory, and analgesic effects of an extract of red propolis. *Acta Pharmacologia Sinica*. 18, 274-276.
- Li, Z., Dong, X., Zhang, J., Zeng, G., Zhao, H., Liu, Y., Qiu, R., Mo, L., Ye, Y. 2014. Formononetin protects TBI rats against neurological lesions and the underlying mechanism. *J Neurol Sci*. 15, 112-117.
- López, B.G., Schmidt, E.M., Eberlin, M.N., Sawaya, A.C. 2014. Phytochemical markers of different types of red propolis. *Food Chem*. 146,174-180.
- Loux, J.J., Smith, S., Salem, H. 1978. Comparative analgesic testing of various compounds in mice using writhing techniques. *Arzneim. Forsch*. 28, 1644–1647.

- Ma, Z., Ji, W., Fu, Q., Ma, S. 2013. Formononetin inhibited the inflammation of LPS-induced acute lung injury in mice associated with induction of PPAR gamma expression. *Inflammation*. 36, 1560-1566. doi: 10.1007/s10753-013-9700-5.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. 1992. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 263, 136-146.
- Martinez, V., Thakur, S., Mogil, J.S., Taché, Y., Mayer, E.A., 1999. Differential effects of chemical and mechanical colonic irritation on behavioral pain response to intraperitoneal acetic in mice. *Pain*. 81, 16– 18.
- McNamara, C.R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D.M., Siemens, J., Deranian, K.L., Zhao, M., Hayward, N.J., Chong, J.A., Julius, D., Moran, M.M., Fanger, C.M., 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 104, 13525-13530.
- Mise Yonar, S., Ural, M.S., Silici, S., Yonar, M.E. 2014. Malathion-induced changes in the haematological profile, the immune response, and the oxidative/antioxidant status of *Cyprinus carpio carpio*: Protective role of propolis. *Ecotoxicology and environmental safety*. 102, 202-209.
- Morimoto, Y., Shimohara, K., Oshima, S., Sukamoto, T., 1991. Effects of the new antiulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of trepenone and cimetidine. *Japanese journal of pharmacology*. 57, 497-505.
- Morsy, A.S., Abdalla, A.L., Soltan, Y.A., Sallam, S.M., El-Azrak Kel, D., Louvandini, H., Alencar, S.M. 2013. Effect of Brazilian red propolis administration on hematological, biochemical variables and parasitic response of Santa Inês ewes during and after flushing period. *Trop Anim Health Prod*. 45, 1609-1618.
- Mossalayi, M.D., Rambert, J., Renouf, E., Micouveau, M., Merillon, J.M. 2013. Grape polyphenols and propolis mixture inhibits inflammatory mediator release from human leukocytes and reduces clinical scores in experimental arthritis. *Phytomedicine* :

international journal of phytotherapy and phytopharmacology. 19, pii: S0944-7113(13)00318-8. doi: 10.1016/j.phymed.2013.08.015.

Nishio, N., Taniguchi, W., Sugimura, Y.K., Yamanaka, M., Kiyoyuki, Y., Yamada, H., Miyazaki, N., Yoshida, M., Nakatsuka, T. 2013. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. *Neuroscience*. 5, 201-212.

Paulino, N., Abreu, S.R., Uto, Y., Koyama, D., Nagasawa, H., Hori, H., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Scremin, A., Bretz, W.A. 2008. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. *Eur J Pharmacol*. 587, 296-301. doi: 10.1016.

Paulino, N., Dantas, A.P., Bankova, V., Longhi, D.T., Scremin, A., de Castro, S.L., Calixto, J.B. 2003. Bulgarian propolis induces analgesic and anti-inflammatory effects in mice and inhibits in vitro contraction of airway smooth muscle. *Journal of Pharmacological Sciences*. 93, 307-313.

Paulino, N., Teixeira, C., Martins, R., Scremin, A., Dirsch, V.M., Vollmar, A.M., Abreu, S.R., de Castro, S.L., Marcucci, M.C. 2006. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of a Brazilian green propolis. *Planta Med*. 72, 899-906.

Piccinelli, A.L., Lotti, C., Campone, L., Cuesta-Rubio, O., Campo Fernandez, M., Rastrelli, L. 2011. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem*. 59, 6484-6491.

Premkumar, L. S., Abooj, M. 2013. TRP channels and analgesia. *Life Sciences*. 92, 415-424.

Prut, L., Belzung, C., 2003. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. *Eur. J. Pharmacol*. 463, 3-33.

- Rathee, P., Chaudhary, H., Rathee, S., Rathee, D., Kumar, V., Kohli, K. 2009. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. *Inflamm Allergy Drug Targets* 8, 229 – 235.
- Ribeiro, A.R.S., Diniz, P.B.F., Estevam, C.S., Pinheiro, M.S., Albuquerque-Júnior, R.L.C., Thomazzi, S.M., 2013. Gastroprotective activity of the ethanol extract from the inner bark of *Caesalpinia pyramidalis* in rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 147, 383-388.
- Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q., 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European Journal of Pharmacology*. 387, 111-118.
- Righi, A.A., Alves, T.R., Negri, G., Marques, L.M., Breyer, H., Salatino, A. 2011. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 91, 2363-2370. doi: 10.1002/jsfa.4468.
- Righi, A.A., Negri, G., Salatino, A. 2013. Comparative chemistry of propolis from eight brazilian localities. *Evidence-based complementary and alternative medicine*. 2013, 267878. doi: 10.1155/2013/267878.
- Robert, A., Nezamis, J.E., Lancaster, C., Hanchar, A.J., 1979. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. *Gastroenterology*. 77, 433-443.
- Rocha, N.F., Oliveira, G.V., Araujo, F.Y., Rios, E.R., Carvalho, A.M., Vasconcelos, L.F., Macedo, D.S., Soares, P.M., Sousa, D.P., Sousa, F.C. 2011. (-)- α -Bisabolol-induced gastroprotection is associated with reduction in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity and neutrophil migration. *Eur J Pharm Sci*. 44, 455-461.

- Rozza, A.L., Hiruma-Lima, C.A., Takahira, R.K., Padovani, C.R., Pellizzon, C.H. 2013. Effect of menthol in experimentally induced ulcers: pathways of gastroprotection. *Chem Biol Interact.* 206, 272–278. doi: 10.1016/j.cbi.2013.10.003.
- Salga, M.S., Ali, H.M., Abdulla, M.A., Abdelwahab, S.I. 2012. Gastroprotective activity and mechanism of novel dichlorido-zinc(II)-4-(2-(5- methoxybenzylidene-neamino) ethyl) piperazin-1-iumphenolate complex on ethanol-induced gastric ulceration. *Chem Biol Interact.* 195, 144-153.
- Sánchez-Mendoza, M.E., Reyes-Ramírez, A., Cruz-Antonio, L., Martínez-Jiménez, L., Rodríguez-Silverio, J., Arrieta, J. 2011. Bioassay-guided isolation of a non-anti-ulcer compound, Tagitinin C, from *Tithonia diversifolia*: role of nitric oxide, prostaglandins and sulfhydryls. *Molecules.* 16, 665-674.
- Sanchez-Mendoza, M.E., Rodriguez-Silverio, J., Rivero-Cruz, J.F., Rocha-Gonzalez, H.I., Pineda-Farias, J.B., Arrieta, J. 2013. Antinociceptive effect and gastroprotective mechanisms of 3,5-diprenyl-4-hydroxyacetophenone from *Ageratina pichinchensis*. *Fitoterapia.* 87, 11-19. doi: 10.1016/j.fitote.2013.03.015.
- Sawaya, A.C., Barbosa da Silva, C. I., Marcucci, M.C. 2011. Analytical methods applied to diverse types of Brazilian propolis. *Chem Cent J.* 1, 5-27.
- Serhan, C.N., Haeggström, J. Z., 2010. Lipid mediators in acute inflammation and resolution: eicosanoids, PAF, resolvins and proteins. *Fundamentals of Inflammation.* Cambridge University press. 153-174.
- Shay, H., Komarov, S.A., Fels, S.S., Meranze, D., Gruenstein, M., Siplet, H., 1945. A simple method for the uniform production of gastric ulceration in the rat. *Gastroenterology.* 5, 43-61.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R., 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain.* 38, 347-352.
- Sun, S.B., Matsumoto, T., Yamada, H., 1991. Effects of a polysaccharide fraction from the roots of *Bupleurum falcatum* L. on experimental gastric ulcer models in rats and mice. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 43, 699-704.

- Szliszka, E., Kucharska, A.Z., Sokół-Łętowska, A., Mertas, A., Czuba, Z.P., Król, W., 2013. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2013, 976415.
- Tebbe, J.J., Mrona, S., Schafer, M.K., Ruter, J., Kobelt, P., Monnikes, H. 2003. Stimulation of neurons in rat ARC inhibits gastric acid secretion via hypothalamic CRF1/2- and NPY-Y1 receptors. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 285, 1075-1083.
- Tielemans, M.M., van Rossum, L.G., Eikendal, T., Focks, J.J., Laheij, R.J., Jansen, J.B., van Oijen, M.G., 2014. Gastrointestinal symptoms in NSAID users in an 'average risk population': results of a large population-based study in randomly selected Dutch inhabitants. International journal of clinical practice. doi: 10.1111/ijcp.12346.
- Toreti, V.C., Sato, H.H., Pastore, G.M., Park, Y.K., 2013. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. Evidence-based complementary and alternative medicine. 2013. 697390.
- Wang, Y., Zhu, Y., Gao, L., Yin, H., Xie, Z., Wang, D., Zhu, Z., Han, X. 2012. Formononetin attenuates IL-1 β -induced apoptosis and NF- κ B activation in INS-1 cells. Molecules. 17, 10052-10064. doi: 10.3390/molecules170910052.
- Wassmann, S., Stumpf, M., Strehlow, K., Schmid, A., Schieffer, B., Bhom, M., Nickenig, G. 2004. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor. Circ Res. 94, 534-541.
- Whimbey, A.E., Denenberg, V.H. 1967. Two independent behavioral dimensions in open-field performance. J. Comp. Physiol. Psychol. 63, 500-504.
- Zhang, C.P., Liu, G., Hu, F.L. 2012. Hydrolysis of flavonoid glycosides by propolis β -glycosidase. Natural product research. 26, 270-273. doi:10.1080/14786419.2010.541877.

Zimmermann, M., 1983. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain*. 16, 109-110.

Figure captions

Figure 1. (A) Representative chromatogram of formononetin standard (peak 1; R_t = 85.5 min); (B) Representative chromatogram of the dry extract of red propolis. The chromatographic conditions used were: column C18 Shim-Pack CLC-ODS, the mobile-phase consisting of formic acid 0.1% (v/v) in acetonitrile (solvent A) and formic acid 0.1% (v/v) in water (solvent B), flow rate of 0.8 mL/min, and detection at 275 nm; R_t - retention time.

Figure 2. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on acetic acid-induced visceral nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3-30 mg/kg), or acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg) before of acetic acid injection. The results are presented as the means $\pm$ SEM (n = 6/group). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** P < 0.001 vs. the vehicle group.

Figure 3. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on formalin induced nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3, 10 or 30 mg/kg), acetylsalicylic acid (ASA, 300 mg/kg), or morphine (Morph, 3 mg/kg) before a formalin injection. The results are presented as the means $\pm$ SEM (n = 6/group). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** P < 0.001 vs. the respective vehicle group.

Figure 4. The effect of the hydroalcoholic extract of red propolis (HERP) on glutamate-induced nociception. Mice were pre-treated with vehicle, HERP (3, 10 or 30 mg/kg), or morphine (Morph, 3 mg/kg) before a glutamate injection. The results are presented as

the means $\pm$ SEM ($n = 6/\text{group}$). ANOVA followed by Bonferroni's test. *** $P < 0.001$ vs. the vehicle group.

Figure 5. HE-stained histological sections of the gastric mucosa specimens in the ethanol-induced ulcer model ($n = 6/\text{group}$). **(a-b)** Vehicle group; **(c-d)** HERP group at 50 mg/kg; **(e-f)** HERP group at 250 mg/kg; **(g-h)** HERP group at 500 mg/kg; and **(i-j)** Omeprazole group. HERP, hydroalcoholic extract of red propolis.

ANEXOS