

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Investigação do possível efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração
diclorometano obtidos da planta *Annona crassiflora* Mart.

Ana Claudia Gontijo Couto

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Investigação do possível efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração
diclorometano obtidos da planta *Annona crassiflora* Mart.

Ana Claudia Gontijo Couto

Prof^a. Dr^a. Cássia Regina da Silva

Monografia apresentada à Coordenação
do Curso de Biotecnologia, da
Universidade Federal de Uberlândia, para
obtenção do grau de Bacharel em
Biotecnologia.

Uberlândia - MG

Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Investigação do possível efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração
diclorometano obtidos da planta *Annona crassiflora* Mart.

Ana Claudia Gontijo Couto

Prof^a. Dr^a. Cássia Regina da Silva

Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso

de Biotecnologia em __/__/__

Prof. Dr. Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG

Junho – 2019

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais uma vitória.

Ao meu marido, Michel, por ter me apoiado e me ajudado diante das dificuldades que enfrentei durante esta fase da minha vida, e por estar sempre presente.

Aos meus pais, Cláudio e Elizimar, por todo apoio e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui.

À minha orientadora Dr^a. Cássia Regina Silva pela oportunidade, dedicação, paciência, e por todos os ensinamentos.

Aos colegas de laboratório, Thiago e Priscilla, que tanto me auxiliaram nos experimentos e desenvolvimento do trabalho, e por sempre compartilharem seu conhecimento.

As minhas amigas, Bruna e Thamires, que tiveram um importante papel durante a graduação, sendo minhas amigas no dia a dia.

Aos colegas, amigos, e professores da graduação que fizeram parte dessa jornada e contribuíram para meu crescimento profissional e pessoal.

RESUMO

O gerenciamento de condições dolorosa ainda é um problema médico a ser resolvido. Dentre os medicamentos utilizados para o gerenciamento da dor, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os opioides são os mais utilizados. A utilização dos AINES está relacionada com danos a função renal e a integridade gástrica, e com a agregação plaquetária. Já os principais efeitos adversos da utilização de opioides são coceira, dependência e tolerância, reduzindo sua utilização em casos de dor crônica. Sendo assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novos tratamentos. A utilização de plantas para tratamento de condições dolorosas já é comum na medicina tradicional. Nesse estudo investigamos o potencial antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da casca dos frutos da *Annona crassiflora* Mart, popularmente conhecida como araticum do cerrado. Para isso foram realizados os testes de nocicepção induzida por formalina e cinamaldeído. Para avaliar a ação do extrato e da fração sobre a locomoção dos animais, foi utilizado o teste de campo aberto. Observamos que o tratamento com o extrato etanólico na dose de 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva dos animais, sem apresentar alteração significativa na locomoção espontânea, enquanto que nas dose de 100 mg/Kg houve redução significativa apenas na segunda fase do teste de formalina, e a dose de 300 mg/Kg não apresentou redução significativa. O tratamento com a fração diclorometano na dose de 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva dos animais, já as doses de 10 e 100 mg/Kg não reduziram a resposta nociceptiva significativamente, nenhuma das doses testadas da fração diclorometano causaram alterações na atividade de locomoção dos animais. Os resultados mostram a atividade antinociceptiva do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da planta *Annona crassiflora* Mart.

Palavras-chaves: *Annona crassiflora* Mart., efeito nociceptivo, formalina.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Dor	1
1.2	Produtos naturais na dor	3
2.	OBJETIVOS	6
2.1	Objetivo Geral	6
2.2	Objetivos Específicos	6
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	6
3.1	Obtenção do material da planta	6
3.2	Animais	7
3.3	Nocicepção induzida por formalina	7
3.4	Nocicepção induzida por cinamaldeído	8
3.5	Campo aberto	8
3.6	Análise Estatística	9
4.	RESULTADOS	9
4.1	Efeito antinociceptivo do extrato etanólico obtido da casca do fruto da planta <i>Annona crassiflora</i> Mart. na dor induzida por formalina	9
4.2	Efeito da administração do extrato etanólico obtido da casca do fruto da planta <i>Annona crassiflora</i> Mart. na locomoção espontânea	11
4.3	Efeito antinociceptivo da fração diclorometano obtida da casca do fruto da planta <i>Annona crassiflora</i> Mart. na dor induzida por formalina	12
4.4	Efeito da administração da fração diclorometano obtida da casca do fruto da planta <i>Annona crassiflora</i> Mart. na locomoção espontânea	14
4.5	Efeito antinociceptivo da fração diclorometano obtido da casca do fruto da planta <i>Annona crassiflora</i> Mart. na dor induzida por cinamaldeído	15
5.	DISCUSSÃO	16
6.	CONCLUSÃO	19
7.	REFERÊNCIAS	20

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal lesão” (LOESER; TREEDE, 2008). Diferentemente da dor, a nocicepção é associada apenas ao processamento de estímulos nocivos que codificam sinais para fornecer informações ao sistema nervoso central (SNC) da existência de lesão (WALL; MELZACK, 1999; JULIUS; BASBAUM, 2001).

Bishop, Gasser e colaboradores sugeriram que os estímulos nocivos eram detectados pelas fibras delgadas ou finamente mielinizadas (A δ) e pelas fibras não mielinizadas (C) (HEINBECKER; BISHOP, 1933; ZOTTERMAN, 1933; CLARK; HUGHES; GASSER, 1935; LANDAU; BISHOP, 1953; COLLINS; NULSET; RANDT, 1960). As fibras A δ são responsáveis por mediar a dor aguda, e são responsivas a extremos de temperatura (<5°C e >45°C) e a estímulos mecânicos intensos. As fibras C amielínicas, em sua maioria, são nociceptores polimodais que respondem a vários estímulos nocivos como mecânicos, químicos e térmicos (BASBAUM et al., 2009; KANDEL et al., 2014).

Os terminais nervosos das fibras C projetam-se principalmente nas lâminas I e II, enquanto as fibras A δ projetam-se nas lâminas I e V. Nessas regiões há o direcionamento da informação nociceptiva para regiões supraespinhais como o tronco encefálico e para o tálamo, devido à presença de neurônios de projeção e interneurônios de segunda ordem (PURVES et al., 2010). Na amígdala, hipotálamo, núcleos talâmicos e na substância periaquedutal há o processamento do componente emocional da dor, enquanto que os aspectos sensoriais são interpretados no córtex somatossensorial.

A transmissão da dor ocorre, portanto, sob o comando de fibras nociceptoras que detectam e conduzem a informação nociceptiva da periferia até o sistema nervoso central. No sistema nervoso central vias anatômicas são ativadas levando a informação para áreas encefálicas que integram a informação nociceptiva com informações de memória, determinando a resposta individual da dor (DALMOLIN, 2010).

A dor pode ser classificada em dois tipos: aguda e crônica, considerando-se a duração de sua manifestação. A dor aguda tem um importante papel fisiológico na proteção tecidual e se estabelece por um curto período de tempo, podendo desaparecer antes mesmo do restabelecimento do tecido lesado. Já a dor crônica é prejudicial ao corpo, e possui duração mínima de três meses, porém, podendo acompanhar o indivíduo pelo resto da sua vida (KUMAR et al., 2015; WOOLF, 2010).

Conforme sua etiologia a dor pode ser classificada em nociceptiva e patológica. A dor nociceptiva tem o papel de proteção fisiológica e é essencial para minimizar o contato com estímulos nocivos. A dor patológica se divide em neuropática e inflamatória, sendo a primeira relacionada a um dano no sistema nervoso podendo ter a existência de dor substancial sem nenhum estímulo nocivo. Já a dor inflamatória é causada pela ativação do sistema imune, e é responsável por aumentar a sensibilidade sensorial, reduzindo o contato físico e o movimento da parte lesionada (WOOLF, 2004, 2010).

Uma Pesquisa Nacional de Entrevista de Saúde, realizada nos Estados Unidos em 2009, mostrou que em um período de 3 meses 16% dos adultos reportaram dores de cabeça severas ou enxaqueca, 15% disseram ter dores no pescoço, 28% relataram dor na parte inferior das costas, e 5% disseram ter dores na face ou na mandíbula (GASKIN; RICHARD, 2012). Câncer, osteoartrite e artrite reumatoide, cirurgias, e problemas espinhais são as quatro maiores causas de dor. A dor pode ser acompanhada de sérios problemas incluindo depressão, absenteísmo,

isolamento social e pensamento suicida. Assim, a dor em um indivíduo também afeta a economia (GOLDBERG; MCGEE, 2011). Turk e Theodore reportaram que em 2010 o custo farmacêutico, voltado para gerenciamento da dor, foi de \$16,4 bilhões de dólares (TURK, 2002). Stewart e colaboradores afirmaram, que condições dolorosas comuns como: artrite, dores de cabeça, dor na lombar, resultaram em um custo de \$ 61,2 bilhões de dólares devido à queda de produtividade para trabalhadores nos Estados Unidos, no ano avaliado de 2002 (STEWART et al., 2007).

Dentre os medicamentos utilizados para o gerenciamento da dor, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) e os opioides são os mais utilizados. Os AINES atuam inibindo a enzima cicloxigenase na periferia e na medula espinhal. Eles se relacionam com danos a função renal, com a integridade gástrica e com a agregação plaquetária. Já os opioides atuam no corno dorsal da medula espinhal impedindo a transmissão da nocicepção e também no controle descendente da dor, e os principais efeitos adversos da utilização de opioides são coceira, dependência e tolerância, limitando sua utilização em casos de dor crônica (DANIEL B CARR, 1999). Em vista desses efeitos adversos, faz-se necessário que novos estudos relacionados aos tratamentos de condições dolorosas sejam desenvolvidos.

Neste sentido, sabe-se da utilização de produtos naturais em patologias diversas como sendo uma das alternativas para o tratamento de diferentes condições dolorosas pela população em geral. Estes produtos naturais são interessantes ferramentas de estudo para a determinação de seu uso de forma mais segura e eficaz, e ainda devido ao seu grande potencial como fonte para a descoberta de novas biomoléculas.

1.2 Produtos naturais na dor

Produtos naturais são de grande importância para o descobrimento de novas moléculas com potencial terapêutico. Essas moléculas podem ser obtidas a partir de plantas,

microrganismos e animais, e podem ser utilizadas em diferentes tratamentos como os de câncer, diabetes e condições dolorosas (GU et al., 2013; HARVEY, 2014). O ácido acetil salicílico, também conhecido como aspirina, foi extraído da planta *Salix alba*, e é amplamente utilizado como anti-inflamatório e analgésico (VANE, 1971). Outro exemplo de produto terapêutico de origem natural é a morfina. Pertencente a classe dos opioides, a morfina foi primeiramente extraída da planta *Papaver somniferum*, e possui um alto poder analgésico (CALIXTO et al., 2005).

O Brasil possui uma extensa biodiversidade que nos permite o acesso a diferentes produtos naturais que podem ser utilizados como imunomoduladores, antimicrobianos, anti-inflamatórios, entre outros (BAILÃO et al., 2015; CARVALHO et al., 2013; CORNARA et al., 2017). O Cerrado é o segundo maior bioma brasileiro e conta com uma enorme variedade de plantas e animais endêmicos (KLINK; MACHADO, 2005; RATTER; RIBEIRO; BRIDGEWATER, 1997). Alguns exemplos de espécies típicas de plantas do cerrado, utilizadas na medicina tradicional, e que já tiveram o efeito anti-inflamatório estudados, são a murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) e também a guabiroba (*Campomanesia xanthocarpa*), utilizadas também para para tratamento de infecção urinária, febre, diabetes e diarreia (DA SILVA et al., 2016; ORLANDI et al., 2011; VELOSO et al., 2010).

Dentre as espécies de plantas, a *Annona crassiflora*, conhecida como araticum do cerrado, pertencente à família Annonaceae, pode ser encontrada nos estados da Bahia, Minas Gerais, São Paulo, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Goiás e Tocantins (LORENZI, 1998). A infusão das folhas do araticum é comumente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório e analgésico para tratamento de feridas, mordida de serpente, diarreia, malária e reumatismo (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; VILAR et al., 2008). Ainda, foi demonstrado que o extrato etanólico, obtido da casca do araticum, possui substâncias com

potencial antioxidante como a rutina, xantoxilina, ácido ferúlico, cafeico, ascórbico e quínico, e vários alcaloides (JUSTINO et al., 2016; ROESLER; CATHARINO; EBERLIN, 2007).

Os alcaloides são conhecidos por causar vasodilatação, por apresentar efeitos anti-hipertensivos e por inibir agregação plaquetária, assim como pelo seu potencial analgésico. Recentemente, Montrucchio e colaboradores reportaram o efeito antinociceptivo de um alcaloide aporfínico S-(+)-dicentrina em modelo de dor visceral em camundongos, e também o efeito desse alcaloide em condições inflamatórias, atenuando a hipersensibilidade mecânica e ao frio, e também reduzindo a nocicepção espontânea (MONTRUCCHIO, 2013).

Adicionalmente, estudos mostraram que a fração hidroalcoólica, obtida do extrato etanólico de folhas do araticum, possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em doenças inflamatórias, onde o acúmulo de leucócitos é crucial para a patofisiologia (OLIVEIRA et al., 2018). Ainda, é possível verificar estudos *in vivo* que demonstram que o extrato etanólico da casca da fruta *Annona crassiflora* Mart. não possui potencial mutagênico ou genotóxico, sugerindo que seu uso é seguro (VILAR et al., 2008; VILAR; FERRI; CHEN CHEN, 2011). Também já foi verificado por Justino e colaboradores que o extrato etanólico e fração diclorometano obtida da casca do fruto da *Annona crassiflora* não apresentam citotoxicidade em testes *in vitro* (JUSTINO et al., 2016).

Nesse sentido, a hipótese desse trabalho é que, o extrato etanólico e a fração diclorometano (rica em alcaloides), obtidas da casca do fruto da *Annona crassiflora* apresentem potencial antinociceptivo, mostrando-se promissoras no tratamento de condições dolorosas, confirmando seu uso na medicina popular. Vale ressaltar que nosso grupo, em parceria com o laboratório do professor Foued, identificou e isolou o composto estefalagina, que é um alcaloide aporfínico, e para o qual temos resultados preliminares demonstrando seu potencial analgésico

e anti-inflamatório. Assim, se faz necessário avaliar se a fração de onde foi extraído, assim como o etanólico, apresentam atividades antinociceptivas similares

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi avaliar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart. na dor induzida pela injeção de formalina.
- Avaliar o efeito antinociceptivo da fração diclorometano obtidas da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart. na dor induzida pela injeção de cinamaldeído.
- Avaliar os efeitos do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart. na locomoção espontânea.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção do material da planta

Os exemplares dos frutos foram coletados na região norte de Minas Gerais, em março de 2015. A planta foi identificada por André Vito Scatigna do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia. A exicata (HUFU68467) foi depositada no herbário da Instituição e registrada no SISGEN com o número de cadastro A9CB28C. O extrato

etanólico e a fração utilizadas foram obtidos através da parceria com o professor Foued Salmen do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (LABIBI).

Para a obtenção do extrato etanólico bruto, a casca dos frutos foi separada da poupa, então passaram pelo processo de secagem e trituração. A extração dos componentes do pó foi feita utilizando etanol 98%. O extrato etanólico bruto foi submetido a extração líquido-líquido, onde se obteve as fases hexano, diclorometano, acetil acetato e butanol. Todas as fases foram analisadas em cromatografia de camada delgada (TLC), para confirmar a presença de alcaloides. Por fim, os alcaloides foram concentrados na fração diclorometano, escolhida para o projeto.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos de 6-8 semanas de idade (20g), provenientes do biotério da Rede de Biotérios da Universidade Federal de Uberlândia, Campus Umuarama, mantidos sob condições de temperatura de 23-25 °C e o com ciclo claro/escuro de 12h, com bolinhas de papel para a confecção de ninhos como enriquecimento de meio, e com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com aprovado no projeto 104/17 pelo comitê de ética animal da UFU- Umuarama.

3.3 Nocicepção induzida por formalina

Os camundongos foram pré-tratados por via oral (gavagem) com 200 µl o extrato etanólico, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, 1h antes da injeção intraplantar (ipl) de 10 µl de formalina (solução 2,5%) na superfície plantar da pata traseira direita. O grupo veículo foi tratado com 200 µl de DMSO 10%, também por via oral (veículo para a diluição dos extratos), e o grupo controle recebeu apenas a injeção ipl de formalina. Imediatamente após a injeção de formalina, os animais foram colocados em câmaras de vidro (9 x 11 x 13 cm) planas e a resposta

nociceptiva foi avaliada por 30 minutos. Foi cronometrado o tempo gasto em lambida e *shaking* da pata injetada e os resultados foram expressos em blocos de 0-5 e de 15-30 minutos.

O mesmo procedimento foi realizado tratando os animais com a fração diclorometano nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg. A dose que desencadeou melhor resposta foi a utilizada para o tratamento nos demais testes.

Foram utilizados 6 animais por grupo, quando o tratamento foi o extrato etanólico. Para o tratamento com a fração diclorometano o número de animais variou de 4 a 9 animais por grupo.

3.4 Nocicepção induzida por cinamaldeído

O procedimento para indução da nocicepção utilizando cinamaldeído foi realizado conforme descrito por Montrucchio, 2013. Os camundongos foram pré-tratados por via oral (gavagem) com 200 μ l da fração diclorometano (30 mg/kg), 1h antes da injeção intraplantar de 20 μ l de cinamaldeído (1,3 μ g / pata) na pata traseira direita. O grupo controle recebeu apenas a injeção ipl de cinamaldeído, sem tratamento. Imediatamente após a injeção de cinamaldeído, os animais foram colocados em câmaras de vidro (9 x 11 x 13 cm) planas e a resposta nociceptiva foi avaliada por 30 minutos. Foi cronometrado o tempo gasto em lambida e *shaking* da pata injetada e os resultados foram expressos como tempo de respostas nociceptivas.

Foram utilizados 5 animais para o grupo controle, e 6 animais para o grupo tratado com a fração diclorometano.

3.5 Campo aberto

Para verificar se o extrato etanólico e fração diclorometano interferem na atividade locomotora espontânea ou no comportamento exploratório dos camundongos foi realizado o teste do campo aberto conforme descrito por DAL et al., 2017). O aparato utilizado foi uma arena retangular (28 x 18 x 12 cm) com a base dividida em 18 áreas iguais. Foi contabilizado,

durante 3 minutos, o número de áreas cruzadas pelo camundongo (*crossing*) e o número de vezes em que ele suspende as patas dianteira (*rearing*). A atividade locomotora, após a administração dos tratamentos, foi comparada com o grupo naive (que não recebeu nenhum tratamento).

Para o tratamento com o extrato etanólico foram utilizados entre 4 e 6 animais por grupo. Para tratamento com a fração diclorometano foram utilizados entre 4 e 8 animais por grupo.

3.6 Análise Estatística

As análises estatísticas dos dados foram realizadas pelos métodos de variância a um critério (*one-way ANOVA*), e teste de comparações múltiplas de Dunnet, de acordo com as variáveis e grupos comparados, sendo que as diferenças foram consideradas significativas para valores de $P < 0,05$. Foi utilizado o programa Graph prism versão 5.

4. RESULTADOS

4.1 Efeito antinociceptivo do extrato etanólico obtido da casca do fruto da planta *Annona crassiflora Mart.* na dor induzida por formalina

O tratamento com extrato etanólico na concentração de 30 mg/Kg produziu uma resposta antinociceptiva nos primeiros 5 minutos após a injeção de formalina, reduzindo a resposta de lambida em 34%, em relação ao grupo controle. Os tratamentos de 100 e 300 mg/Kg não apresentaram redução significativa da resposta nociceptiva, sendo que o tratamento de 100 mg/Kg reduziu a resposta em 35%, e o tratamento com 300 mg/Kg reduziu a resposta em 25% (Figura 1. A).

Na fase inflamatória, analisada de 15 a 30 minutos, é possível observar a redução significativa da resposta nociceptiva em 21%, quando os animais foram tratados com o extrato na concentração de 30 mg/Kg. Diferentemente do observado nos primeiros 5 minutos de

resposta, a dose de 100 mg/Kg, quando avaliada na fase inflamatória, apresentou uma redução significativa de 33% da resposta nociceptiva. O tratamento de 300 mg/Kg não apresentou diminuição significativa na resposta nociceptiva, sendo a redução de apenas 3% (Figura 1. B).

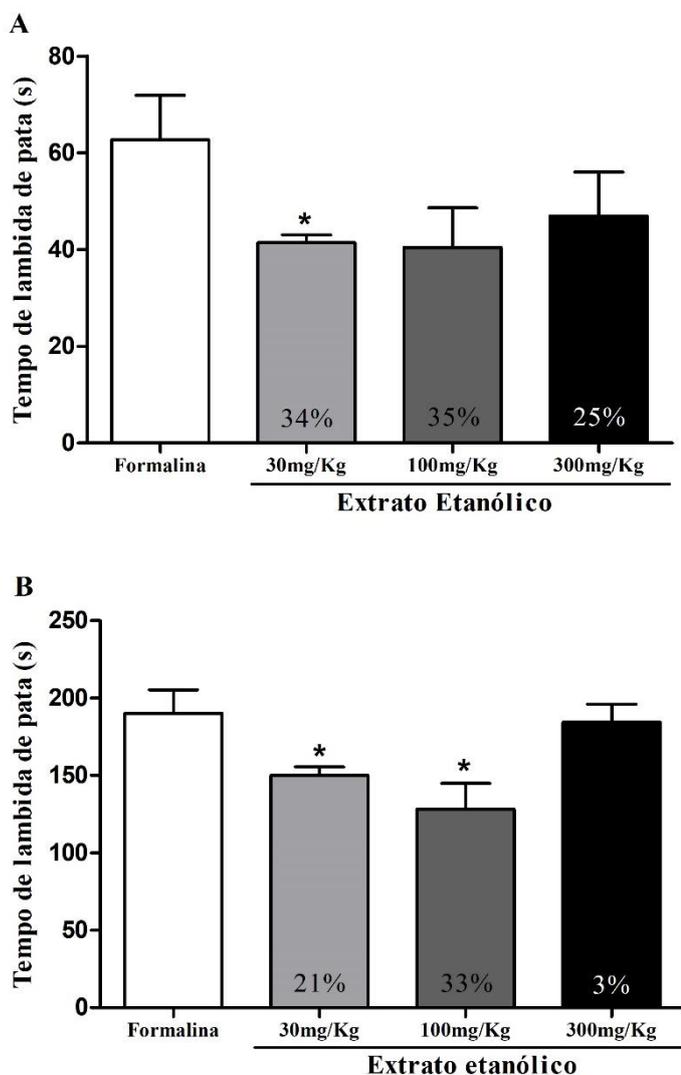


Figura 1 Efeitos da administração oral do extrato etanólico (30-300 mg/kg) no comportamento de dor induzida por formalina em camundongos durante a A) primeira fase (neurogênica, 0-5 min) e B) segunda fase (inflamatória, 15-30 min). N = 6 animais por grupo. As colunas representam a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de formalina (one-way ANOVA, seguida por teste de Dunnet).

4.2 Efeito da administração do extrato etanólico obtido da casca do fruto da planta

Annona crassiflora Mart. na locomoção espontânea

Através do campo aberto, foi mensurado o número de cruzamentos e de rearing dos animais, para analisar os efeitos do tratamento na locomoção espontânea dos animais. Os tratamentos com o extrato etanólico nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg não causaram alterações no número de vezes em que os animais suspenderam as patas dianteiras (*rearing*), quando comparados com os animais naive, que não receberam nenhum tratamento (Figura 2. A). É possível observar também que não houve alteração significativa no número de cruzamentos quando os animais receberam a dose de 30 mg/Kg, enquanto que nas doses de 100 e 300 mg/Kg os animais reduziram significativamente o número de cruzamentos (Figura 2. B).

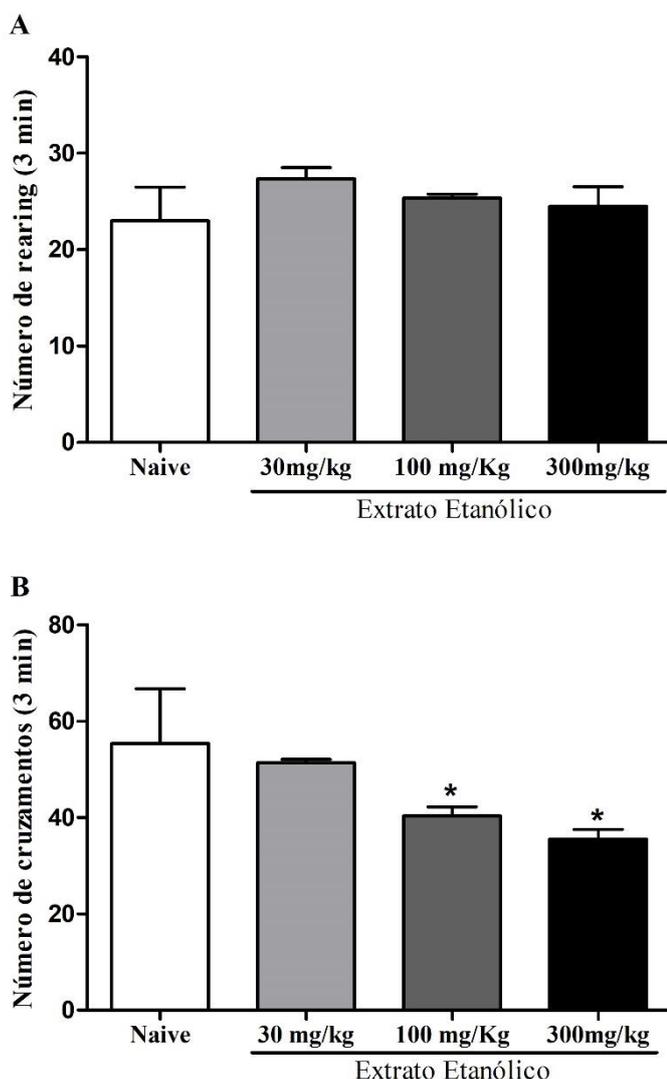


Figura 2 Locomoção espontânea após uma hora da administração do extrato etanólico nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg. A) Número de vezes em que os animais suspenderam as patas dianteiras (rearing). B) Número de áreas cruzadas pelos animais. Naive (N= 4), 30 mg/Kg (N= 6), 100 mg/Kg (N= 6), 300 mg/Kg (N= 6). As colunas representam a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de formalina (one-way ANOVA, seguida por teste de Dunnet).

4.3 Efeito antinociceptivo da fração diclorometano obtida da casca do fruto da planta

Annona crassiflora Mart. na dor induzida por formalina

O tratamento com a fração diclorometano na concentração de 30 mg/Kg produziu uma resposta antinociceptiva nos primeiros 5 minutos após a injeção de formalina, reduzindo a resposta de lambida em 54%, em relação ao grupo controle. Os tratamentos de 10 e 100 mg/Kg não apresentaram redução significativa da resposta nociceptiva, sendo que o tratamento de 10

mg/Kg reduziu a resposta em 46%, e o tratamento com 100 mg/Kg reduziu a resposta em 9% (Figura 3. A).

Na fase inflamatória, analisada de 15 a 30 minutos, é possível observar a redução significativa da resposta nociceptiva em 41%, quando os animais foram tratados com o extrato na concentração de 30 mg/Kg. Conforme visto nos primeiros 5 minutos de análise, os tratamentos de 10 e 100 mg/Kg não apresentaram diminuição significativa na resposta nociceptiva, sendo que o tratamento de 10 mg/Kg reduziu a resposta em 37%, e o tratamento com 100 mg/Kg não apresentou redução (Figura 1. B). A dose de 30 mg/Kg desencadeou melhor resposta nos dois tempos analisados, portanto foi a dose utilizada para os demais testes.

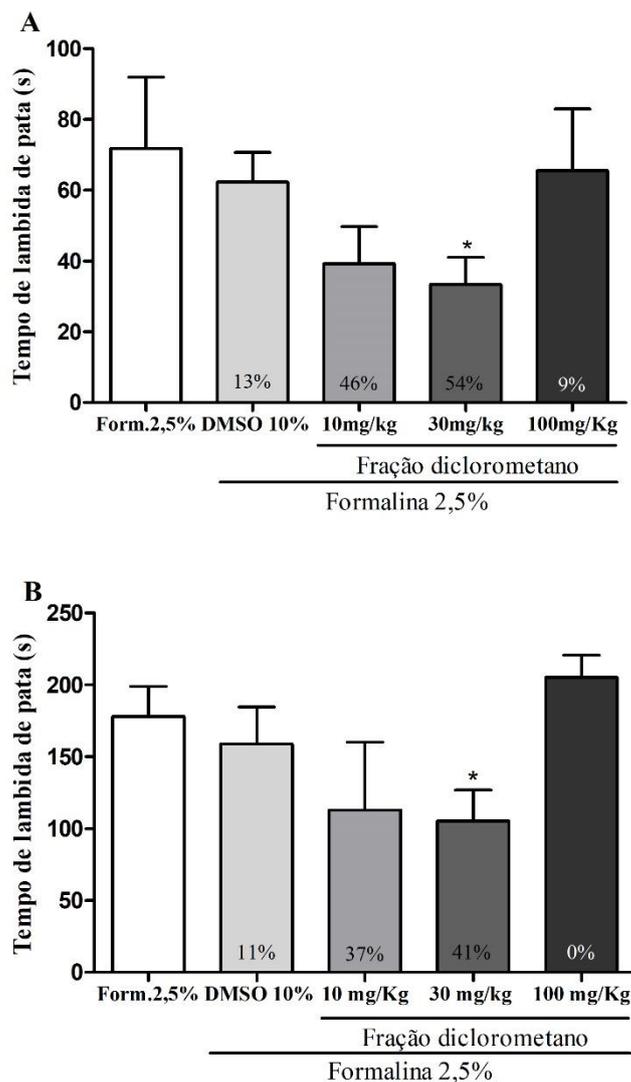


Figura 3 Efeitos da administração oral da fração diclorometano (30 e 100 mg/kg) no comportamento de dor induzida por formalina em camundongos durante a A) primeira fase (neurogênica, 0-5 min) B) segunda fase (inflamatória, 15-30 min). Form. (N= 6), DMSO (N= 6), 10 mg/Kg (N= 4), 30 mg/Kg (N= 9), 100 mg/Kg (N= 9). As colunas representam a média \pm S.E.M. * $p < 0,05$ em comparação com o grupo de formalina (one-way ANOVA, seguida por teste de Dunnet).

4.4 Efeito da administração da fração diclorometano obtida da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart. na locomoção espontânea

Através do campo aberto, foi mensurado o número de cruzamentos e de *rearing* dos animais, para analisar os efeitos do tratamento na locomoção espontânea dos animais. Os tratamentos com a fração diclorometano nas doses de 10, 30 e 100 mg/Kg não induziram alterações no número de *rearing* (Figura 4. A), assim como no número de cruzamentos (Figura 4. B), quando comparados aos animais naive.

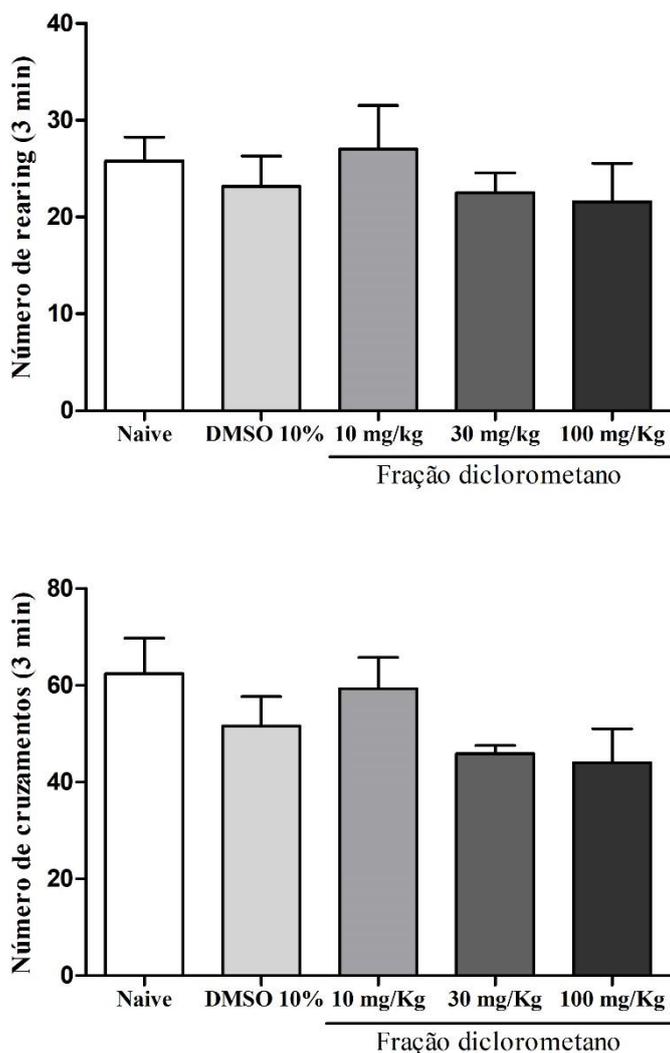


Figura 4 Locomoção espontânea após uma hora da administração da fração diclorometano nas doses de 30 e 100 mg/Kg. A) Número de vezes em que os animais suspenderam as patas dianteiras (rearing). B) Número de áreas cruzadas pelos animais. Naive (N= 6), DMSO (N= 7), 10 mg/Kg (N= 4), 30 mg/Kg (N= 8), 100 mg/Kg (N= 8). As colunas representam a média \pm S.E.M. *p <0,05 em comparação com o grupo de formalina (one-way ANOVA, seguida por teste de Dunnet).

4.5 Efeito antinociceptivo da fração diclorometano obtido da casca do fruto da planta *Annona crassiflora* Mart. na dor induzida por cinamaldeído

Foi investigado o efeito antinociceptivo da fração diclorometano sobre respostas nociceptivas induzidas pelo cinamaldeído (Figura 5). Podemos observar que houve diminuição

da resposta de lambida de pata, em 56%, quando os animais foram submetidos ao tratamento com a fração diclorometano na dose de 30 mg/Kg, e comparados aos animais controle.

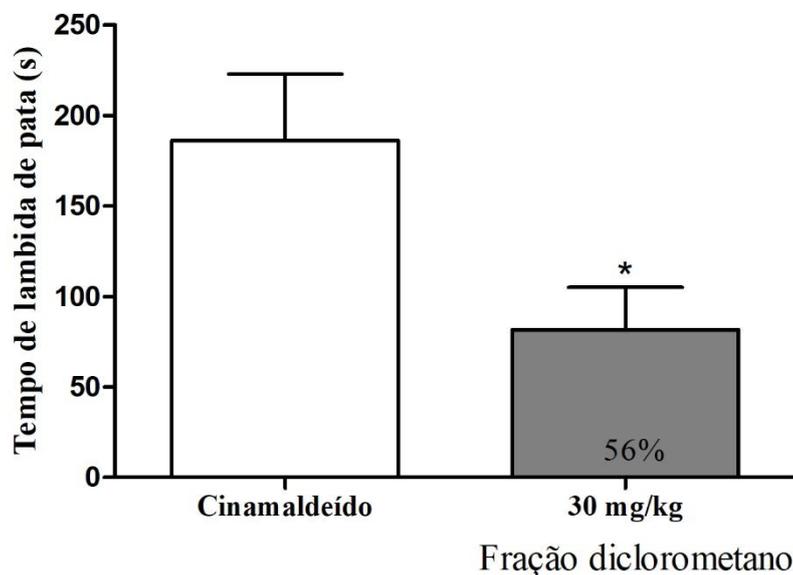


Figura 5 Efeitos da administração oral da fração diclorometano 30 mg/kg no comportamento de dor induzida por cinamaldeído em camundongos durante o tempo de 30 minutos. Cinamaldeído (N= 5), 30 mg/Kg (N=6). As colunas representam a média \pm S.E.M. *p <0,05 em comparação com o grupo de formalina (teste T, seguida por teste de Dunnet).

5. DISCUSSÃO

Os extratos obtidos a partir de diferentes partes da planta *Annona crassiflora* Mart. apresentam diversas atividades biológicas como observado em diversos estudos, capacidade antioxidante, antibacteriana, antimutagênica, entre outras (DE SOUZA et al., 2012; TAKAHASHI, 2006; JUSTINO et al., 2016; ROESLER; CATHARINO; EBERLIN, 2007). Entre os principais compostos biologicamente ativos presentes nos frutos, sementes, e folhas do araticum, estão flavonoides, diversos alcaloides e acetogeninas (EGYDIO, 2013; JUSTINO et al., 2016; LAGE et al., 2014). Os alcaloides são substâncias com vários efeitos terapêuticos, incluindo atividade anti-inflamatória e analgésica (BARBOSA-FILHO et al., 2006; CARLO et al., 1999; SHOAIIB et al., 2016). Estudos fitoquímicos realizados pelo nosso grupo mostraram

que a fração diclorometano, obtida do extrato etanólico (etanólico), é rica em alcaloides, entre eles o majoritário é o alcaloide aporfínico estefalagina (PEREIRA et al., 2017). Nesse estudo avaliamos o potencial antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano obtida da casca do fruto da planta *Annona crassiflora*, em modelos de dor induzidos por formalina e cinamaldeído.

A utilização do teste da formalina é amplamente utilizado como modelo de dor em roedores (SHIELDS et al., 2010). A nocicepção induzida por formalina, apresenta duas fases distintas de resposta antinociceptiva. A primeira fase, conhecida como fase neurogênica, ocorre em roedores 5 minutos após a injeção de formalina, e corresponde a ativação de neurônios sensoriais aferentes primários, com a liberação local de substância P e de bradicinina (SHIBATA et al., 1989). A segunda fase, ou fase inflamatória, é caracterizada por uma reação inflamatória na periferia e por sensibilização central, envolvendo mediadores inflamatórios como histamina, prostaglandina e bradicinina, e acontece entre 15 e 30 minutos após a aplicação de formalina (MCNAMARA et al., 2007; TJØLSEN et al., 1992). Pesquisas recentes mostram que em concentrações de formalina inferiores a 1% esta substância pode atuar como um ativador de receptores do tipo TRPA1, enquanto que concentrações maiores podem atuar sobre diferentes vias nociceptivas e inflamatórias (MCNAMARA et al., 2007; SHIELDS et al., 2010).

Em nosso estudo observamos que a administração oral do extrato etanólico na concentração de 30 mg/Kg foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva induzida por formalina 2,5% nos animais tanto na fase neurogênica, quanto na inflamatória. Já a administração da fração diclorometano na dose de 30 mg/Kg apresentou efeito antinociceptivo significativo nas duas fases. Como foi utilizada concentração de formalina de 2,5%, que, como já descrito, é capaz de atuar sobre vias alternativas ao TRPA1, é possível que o efeito antinociceptivo do extrato e da fração possam ser associados a um efeito anti-inflamatório. Em acordo com nossos resultados, já foi visto por Costa Oliveira et al. (2018) que a administração oral da fração hidroalcoólica

obtidas das folhas da *Annona crassiflora* reduziram a resposta nociceptiva na segunda fase no teste da formalina (OLIVEIRA et al., 2018).

A nocicepção induzida por cinamaldeído é caracterizada pela ativação de receptores TRPA1, sendo este composto um agonista destes receptores e também utilizado como modelo de dor em roedores. O tratamento oral da fração diclorometano 30 mg/Kg reduziu o tempo de resposta comparado com o animal controle, que recebeu apenas a injeção intraplantar de cinamaldeído. Vale ressaltar aqui que há outros possíveis mecanismos de antinocicepção a serem explorados como a inibição da ação de outras moléculas como o glutamato, serotonina, histamina (MURRAY; PORRECA; COWAN, 1988; RIOS et al., 2013; RUJJANAWATE; KANJANAPOTHI; PANTHONG, 2003). Adicionalmente, Oliveira (2017) em estudos realizados em nosso laboratório, relatou que os efeitos do alcaloide aporfínico estefalagina, obtido da fração diclorometano obtida da casca do fruto do araticum, reduziu a resposta nociceptiva dos animais em modelos de dor induzidos por cinamaldeído, capsaicina e formalina 1%, e também atuou inibindo o influxo de cálcio causado pela capsaicina em sinaptossomas da medula espinhal (OLIVEIRA, 2017). Em concordância com este estudo, Montrucchio e colaboradores (2013) demonstraram o efeito antinociceptivo do alcaloide aporfínico S-(+)-Dicentrina em modelos de dor utilizando capsaicina, cinamaldeído e adjuvante completo de Freund (CFA), associando esta ação a uma possível modulação dos receptores TRPA1 (MONTRUCCHIO, 2013).

Para o desenvolvimento de novas drogas analgésicas é de grande importância avaliarmos a possível ocorrência de efeitos adversos, como sedação ou desordens locomotoras, relacionados com a administração do tratamento (NEGUS et al., 2006). Ainda, é importante confirmarmos que as alterações fenotípicas que estamos observando durante a realização dos testes antinociceptivos se referem a modulação de vias nociceptivas e não respostas outras que afetam estas características fenotípicas, como possíveis alterações na atividade locomotora. Neste

sentido, o teste de campo aberto foi utilizado para excluirmos a possibilidade da ação antinociceptiva do extrato etanólico e da fração diclorometano estarem relacionados com distúrbios na locomoção e na atividade exploratória dos animais, o que afetaria a resposta dos mesmos. O número de cruzamentos indica a atividade locomotora, enquanto o número de *rearing* indica a atividade exploratória (RODRIGUES et al., 2018).

No tratamento oral com o extrato etanólico não houve alterações na atividade exploratória dos animais em nenhuma das doses administradas, quanto que na atividade locomotora, houve uma redução no número de cruzamentos nas doses administradas de 100 e 300 mg/Kg em relação ao grupo naive. Contudo, a dose 30 mg/Kg que demonstrou melhor atividade analgésica nas duas fases da formalina, não levou ao desenvolvimento de alterações na atividade exploratória ou locomotora dos animais. Ao analisar o tratamento feito com a fração é possível observar que não houve redução significativa da atividade de locomoção e exploratória dos animais, em nenhuma das concentrações administradas.

Assim, observamos que o efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano, obtidos da casca dos frutos da *Annona crassiflora* Mart., se mostram promissores, e podem, possivelmente, ter parte de seu efeito antinociceptivo associado a presença do alcaloide estefalagina.

6. CONCLUSÃO

Nosso estudo demonstrou a atividade antinociceptiva do extrato etanólico e fração diclorometano, obtidas da casca dos frutos da planta *Annona crassiflora*, em modelos de dor induzido por formalina e cinamaldeído. Nosso estudo também sustenta a utilização dessa espécie na medicina tradicional.

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. 1a ed. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1987.

BAILÃO, E. F. L. C. et al. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 10, p. 23760–23783, 2015.

BARBOSA-FILHO, J. M. et al. Anti-inflammatory activity of alkaloids: a twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 1, p. 109–139, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Review Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. p. 267–284, 2009.

CALIXTO, J. B. et al. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 106, n. 2, p. 179–208, 2005.

CARLO, G. DI et al. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.

CARVALHO, B. M. A. et al. Snake Venom PLA 2 s Inhibitors Isolated from Brazilian Plants: Synthetic and Natural Molecules . **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–8, 2013.

CORNARA, L. et al. Therapeutic properties of bioactive compounds from different honeybee products. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. JUN, p. 1–20, 2017.

DA SILVA, É. R. S. et al. Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg. **Inflammation**, v. 39, n. 4, p. 1462–1468, 2016.

DALMOLIN, G. D. EFEITO ANTINOCICEPTIVO DA TOXINA TX3-3 ISOLADA DO

VENENO DA ARANHA *Phoneutria nigriventer* EM MODELOS ANIMAIS DE DOR. 2010.

DANIEL B CARR, L. C. G. O U D A S; POSTANAESTHESIA. What is acute pain? **the Lancet**, v. 353, n. figure 3, p. 2051–58, 1999.

DE PRÁ, S. D. T. et al. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 195, n. May 2016, p. 283–297, 2017.

DE SOUZA, V. R. et al. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 1, p. 381–386, 2012.

EGYDIO, A. P. M.; VALVASSOURA, T. A.; SANTOS, D. Y. A. C. Geographical variation of isoquinoline alkaloids of *Annona crassiflora* Mart. from cerrado, Brazil. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 46, p. 145–151, 2013.

GASKIN, D. J.; RICHARD, P. The economic costs of pain in the United States. **Journal of Pain**, v. 13, n. 8, p. 715–724, 2012.

GOLDBERG, D. S.; MCGEE, S. J. Pain as a global public health priority. **BMC Public Health**, v. 11, n. 1, p. 770, 2011.

GU, J. et al. Use of Natural Products as Chemical Library for Drug Discovery and Network Pharmacology. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–10, 2013.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. n. September, 2014.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. v. 413, n. September, p. 203–210, 2001.

JUSTINO, A. B. et al. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of

antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities.

Bioorganic Chemistry, v. 69, p. 167–182, 2016.

KANDEL, E. R. et al. **Princípios de Neurociências - Kandel - 5ª Ed.**, 2014.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian Cerrado. v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KUMAR, N. et al. Descending control of pain. **Office of The Army Surgeon General**, v. 26, n. August, p. 1–50, 2015.

LAGE, G. A. et al. The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, v. 28, n. 11, p. 808–811, 2014.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, n. 3, p. 473–477, 2008.

MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 2007.

MONTRUCCHIO, D. P.; CÓRDOVA, M. M.; SOARES SANTOS, A. R. Plant Derived Aporphinic Alkaloid S-(+)-Dicentrine Induces Antinociceptive Effect in Both Acute and Chronic Inflammatory Pain Models: Evidence for a Role of TRPA1 Channels. **PLoS ONE**, v. 8, n. 7, p. 2–10, 2013.

MURRAY, C. W.; PORRECA, F.; COWAN, A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test. An animal model of tonic pain. **Journal of Pharmacological Methods**, v. 20, n. 2, p. 175–186, 1988.

NEGUS, S. S. et al. Preclinical Assessment of Candidate Analgesic Drugs: Recent Advances and Future Challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, n. 2, p. 507–514, 2006.

OLIVEIRA, C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart . in mice.

Inflammopharmacology, n. 0123456789, 2018.

OLIVEIRA, K. R. DE. **EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO TRATAMENTO ORAL COM O ALCALOIDE APORFÍNICO ESTEFALAGINA : ENVOLVIMENTO DE RECEPTORES TRPs**. Disponível em:

<<https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/22037>>.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1469–1476, 2011.

PEREIRA, M. N. et al. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 324–329, 2017.

RATTER, J. A.; RIBEIRO, J. F.; BRIDGEWATER, S. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. **Annals of Botany**, v. 80, n. 3, p. 223–230, 1997.

RIOS, E. R. V. et al. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. **Chemico-Biological Interactions**, v. 203, n. 3, p. 573–579, 2013.

RODRIGUES, R. et al. Root bark of *Discaria americana* attenuates pain : A pharmacological evidence of interaction with opioidergic system and TRP / ASIC channels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 227, n. March, p. 258–267, 2018.

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; EBERLIN, M. N. Food Chemistry Antioxidant activity of *Annona crassiflora* : Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. v. 104, p. 1048–1054, 2007.

RUJJANAWATE, C.; KANJANAPOTHI, D.; PANTHONG, A. Pharmacological effect and toxicity of alkaloids from *Gelsemium elegans* Benth. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 1, p. 91–95, 2003.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: Characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347–352, 1989.

SHIELDS, S. D. et al. Pain Behaviour in the Formalin Test Persists after ablation of the great majority of C-fibers nociceptors. **PAIN**, v. 19, n. 2, p. 161–169, 2010.

SHOAI, M. et al. Scientific investigation of crude alkaloids from medicinal plants for the management of pain. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 1, p. 1–8, 2016.

STEWART, W. F. et al. Lost productive time and costs due to common conditions in the US workforce. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 49, n. 6, p. 672–679, 2007.

TAKAHASHI, J. A. et al. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. **Natural Product Research**, n. 20, p. 21–26, 2006.

TJØLSEN, A. et al. Review Article The formalin test : an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TURK, D. C. Clinical effectiveness and cost-effectiveness of treatments for patients with chronic pain. **Clinical Journal of Pain**, v. 18, n. 6, p. 355–365, 2002.

VANE, J. R. INHIBITION OF PROSTAGLANDIN SYNTHESIS AS A MECHANISM OF ACTION FOR ASPIRIN-LIKE DRUGS. **Nature**, v. 231, n. 5313, p. 655–657, 1971.

VELOSO, C. C. et al. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness behavior induced by

lipopolysaccharide in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 132, n. 1, p. 355–358, 2010.

VILAR, J. et al. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice.

Brazilian Journal of Biology, v. 68, n. 1, p. 141–147, 2008.

VILAR, J.; FERRI, P.; CHEN CHEN, L. Genotoxicity investigation of araticum(*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test. **Instituto**

Internacional de Ecologia, v. 71, n. 1, p. 197–202, 2011.

WOOLF, C. J. Pain : Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Management:Review. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, p. 441–451, 2004.

WOOLF, C. J. Review series introduction What is this thing called pain? **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3742–3744, 2010.

ZOTTERMAN, Y. Studies in the peripheral nervous mechanism of pain. **Acta Med Scand** 80:1–64, 1933.