

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

Renata Foschini Magon

Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso das folhas da
Annona crassiflora (Araticum)

UBERLÂNDIA – MG

2019

Renata Foschini Magon

Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso das folhas da
Annona crassiflora (Araticum)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como pré-requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II, código 054).

Orientador: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

UBERLÂNDIA – MG

2019

Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso das folhas da
Annona crassiflora (Araticum)

Trabalho de conclusão de curso aprovado
como requisito parcial à obtenção do grau de
Médico Veterinário no curso de Medicina
Veterinária da Universidade Federal de
Uberlândia.

Uberlândia, 29 de novembro de 2019

Profª Drª Celene Maria de Oliveira Simões Alves - UFU/MG

Profª. Drª. Celina Monteiro da Cruz Lotufo – UFU/MG

Dra. Taís de Campos Lima – UFU/MG

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha mãe, Regina, e meus avós, Leonardo e Marly por todo apoio e incentivo para que eu pudesse chegar até aqui.

Ao meu namorado, Victor, por ter me apoiado e me ajudado diante das dificuldades que enfrentei durante esta e outras fases da minha vida. Por ter me ouvido sempre que precisei e por estar sempre presente.

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Celene Maria de Oliveira Simões Alves pela oportunidade, dedicação, paciência e por todos os ensinamentos durante a nossa trajetória juntas. Por ter me aguentado nas mensagens, nos e-mails e sempre com muita calma e carinho ter me respondido, me ensinado e me direcionado quando eu estava perdida.

Aos colegas de laboratório, Taís, Victor Costa e Victor Augusto Costa, que sempre me auxiliaram nos experimentos e me ajudaram quando eu mais precisava, e por sempre compartilharem seus conhecimentos.

À minha amiga, Aline Vieira, que foi muito importante para mim durante a graduação, sempre me ouviu reclamar, chorar, desabafar. Foi minha amiga do dia a dia.

À Rede de Biotérios de Roedores (REBIR)/UFU por disponibilizar os animais e o local adequado para a realização deste trabalho.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação (PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio e incentivo ao desenvolvimento desde trabalho.

RESUMO

Plantas medicinais são espécies vegetais utilizadas com fins terapêuticos e/ou profiláticos, ações estas muitas vezes associadas à presença de metabólitos secundários com atividades biológicas, dentre eles, os terpenos, flavonoides, alcaloides e as acetogeninas. *Annona crassiflora* (AC) é uma espécie típica do Cerrado brasileiro e estudos fitoquímicos detectaram a presença dos referidos compostos, aos quais têm sido atribuídas propriedades anti-inflamatórias. Considerando que substâncias com ações anti-inflamatórias podem também diminuir a produção ou bloquear a ação de mediadores algésicos, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina, não é incomum encontrarmos drogas que possuam ambas as atividades farmacológicas, analgesia e anti-inflamatória. Dessa forma, neste estudo, investigamos possíveis efeitos analgésicos do extrato aquoso liofilizado das folhas da AC em modelos experimentais *in vivo* de nocicepção. Diferentes modelos animais de nocicepção estão bem estabelecidos na literatura, dentre eles os testes da placa quente e da formalina, os quais foram utilizados neste estudo. Para a preparação do extrato aquoso, as folhas da AC foram coletadas em campos de vegetação espontânea na Fazenda Santa Rita, em Lassance, MG. Depois de selecionadas e lavadas, as folhas foram secas em estufa a 45 °C durante 48 horas. Em seguida, as folhas secas foram trituradas e colocadas em proveta contendo água destilada na proporção de 10% (m/v), por 48 horas, à temperatura ambiente. O extrato obtido foi duplamente filtrado, em algodão e papel de filtro, congelado a – 20 °C e, posteriormente, liofilizado. O extrato aquoso liofilizado da *A. crassiflora* (EAAC) foi armazenado a – 20 °C até o momento do uso. Para os testes da placa quente e da formalina foram utilizados camundongos BALB/c divididos em cinco grupos (G1 a G5), os quais receberam os seguintes tratamentos, por via oral (v.o.): G1=carboximetilcelulose (CBX) 0,5%; G2=indometacina (INDO); G3=EAAC 30 mg/Kg; G4=EAAC 55 mg/Kg; G5=EAAC 100 mg/Kg. No teste da placa quente, não foi utilizado o grupo tratado com indometacina. Neste teste, após 0, 30, 60 e 90 minutos os tratamentos por v.o., foi avaliado o tempo de latência, ou seja, o tempo, em segundos, para o animal, em cada grupo experimental, exibir as primeiras reações de dor (saltos, lambadura, retirada ou sacudida das patas dos membros posteriores ou anteriores). No teste da formalina, após 60 minutos os tratamentos por v.o., os animais em todos os grupos experimentais, incluindo o grupo tratado com indometacina, receberam uma injeção intraplantar de formalina 2% na pata posterior direita (20 µl/pata). Em seguida, cada animal foi colocado individualmente no aparato

campo aberto para a observação comportamental e foi registrado o tempo total que o animal apresentou reações indicativas de dor nos intervalos de 0 a 15 e de 15 a 30 minutos. De modo geral, os resultados obtidos mostraram que o EAAC não induziu efeito de hipotalgesia térmica estatisticamente significativa nas condições experimentais utilizadas; no teste da formalina, na primeira fase (0-15 min), o EAAC produziu efeito antinociceptivo dose-independente, comparado ao grupo controle negativo tratado com CBX. Contudo, efeito antinociceptivo não foi observado na segunda fase do referido teste. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que o EAAC possui efeito antinociceptivo devido, pelo menos em parte, à possível inibição de vias nociceptivas periféricas.

Palavras-chave: *Annona Crassiflora*. Placa quente. Formalina. Analgesia. Antinocicepção.

ABSTRACT

Medicinal plants are plant species used for therapeutic and / or prophylactic purposes, actions which are often associated with the presence of secondary metabolites with biological activities, including terpenes, flavanoids, alkaloids and acetogenins. *Annona crassiflora* (AC) is a typical species of the Brazilian Cerrado and phytochemical studies have detected the presence of these compounds, which have been attributed anti-inflammatory properties. Considering that substances with anti-inflammatory actions can also decrease the production or block the action of algæ mediators, such as prostaglandins, histamine, serotonin and bradykinin, it is not uncommon to find drugs that have both pharmacological, analgesic and anti-inflammatory activities. In this study, we investigated possible analgesic effects of the lyophilized aqueous extract of the AC leaves in experimental models *in vivo*. Different animal models of nociception are well established in the literature, among them the hot plate and formalin tests, which were used in this study. For the preparation of the aqueous extract, the leaves of the CA were collected in spontaneous vegetation fields at Fazenda Santa Rita in Lassance, MG. After being selected and washed, the leaves were dried in an oven at 45°C for 48 hours. Then, the dried leaves were crushed and placed in a beaker containing 10% (m / v) distilled water for 48 hours at room temperature. The extract obtained was double filtered, in cotton and filter paper, frozen at - 20 °C and, later, lyophilized. The freeze-dried aqueous extract of *A. crassiflora* (EAAC) was stored at - 20 °C until the moment of use. For the hot plate and formalin tests, BALB / c mice were used, divided into five groups (G1 to G5), which received the following treatments, orally: G1 = 0.5% carboxymethylcellulose (CBX); G2 = indomethacin (INDO); G3 = EAAC 30 mg / kg; G4 = EAAC 55 mg / kg; G5 = EAAC 100 mg / kg. In the hot plate test, the indomethacin-treated group was not used. In this test, after 0, 30, 60 and 90 minutes the oral treatments, the latency time was evaluated, that is, the time, in seconds, for the animal, in each experimental group, to show the first nociception reactions (jumps , licking, removing or shaking the legs of the hind or forelimbs). In the formalin test, after 60 minutes of treatment by v.o., animals in all experimental groups, including the group treated with indomethacin, received an intraplantar injection of 2% formalin in the right posterior paw (20 µl / paw). Then, each animal was placed individually in the open field apparatus for behavioral observation.

Then, the total time that the animal had reactions indicating pain in the intervals from 0 to 15 and from 15 to 30 minutes was recorded. In general, the results obtained showed that EAAC did not induce a statistically significant effect of thermal hypoalgesia in the experimental conditions used; in the formalin test, in the first phase (0-15 min), EAAC produced a dose-independent antinociceptive effect, compared to the negative control group treated with CBX. However, an antinociceptive effect was not observed in the second phase of the test. Taken together, the results obtained suggest that EAAC has an antinociceptive effect due, at least in part, to the possible inhibition of peripheral nociceptive pathways.

Keywords: *Annona Crassiflora*. Hot plate test. Formalin. Analgesia. Antinociception.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.2 <i>Annona crassiflora</i> Mart.....	13
2.3 Atividades biológicas associadas à <i>Annona Crassiflora</i>	14
2.4 Metabólitos secundários	16
2.4.1 Flavonoides.....	16
2.4.2 Acetogeninas	17
2.4.3 Alcaloides.....	18
2.4.4 Terpenos	18
2.5 Definição de dor nociceptiva e processo inflamatório. Principais modelos de nocicepção: Placa quente e Teste da formalina.	20
3 JUSTIFICATIVA	22
4 OBJETIVOS	23
4.1 Objetivo Geral	23
4.2 Objetivos Específicos	23
5 METODOLOGIA	23
5.1 Local de Execução.....	23
5.2 Material vegetal	23
5.3 Obtenção do extrato aquoso	23
5.4 Animais.....	24
5.5.1 Teste da placa quente.....	25
5.5.2 Teste da formalina	25
5.6 Protocolo de eutanásia	26
5.7 Análise Estatística	26

6 RESULTADOS	26
6.1 Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso da <i>Annona crassiflora</i> avaliada por meio do teste da placa quente.....	26
6.2 Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso da <i>Annona crassiflora</i> avaliada por meio do teste da formalina	28
7 DISCUSSÃO	29
8 CONCLUSÃO	32
REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é conhecido por ser um dos países que apresenta uma das maiores biodiversidades do planeta, tanto na flora como na fauna (OLIVEIRA, S.C.C et al., 2004; ÁVILA, R. et al., 2010; ARRUDA H.S, et al., 2012; NASORRY, D.C et al., 2012; citados por ARRUDA, H et al., 2015). Além de apresentar uma grande riqueza natural, o país também abriga em seu território diferentes povos, dentre eles, indígenas, caboclos, ribeirinhos, quilombolas, todos eles dotados de enorme conhecimento empírico sobre as plantas e o seu ambiente, pois ao longo da história da humanidade aprenderam a conviver com esses elementos e a utilizá-los em favor de seus interesses, muitas vezes para garantir a obtenção de alimentos e de fontes para a preparação de misturas “medicamentosas” e, assim, a sua sobrevivência (RODRIGUES & CARVALHO, 2001).

Diante ao uso popular empírico de diferentes espécies vegetais como fontes terapêuticas, uma ciência que tem sido fortalecida é a etnobotânica, a qual estuda as interações diretas entre o homem e as plantas e analisa como uma comunidade as utiliza. Assim, a etnobotânica contribui para a aproximação entre o conhecimento científico e o tradicional e visa, dentre outros, obter informações sobre os usos de plantas medicinais (MARTINS et al., 2005; RICARDO, 2010 citado por LEITE, I.A, et al., 2015; RAHMAN, I.U, et al., 2019).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), atualmente, estima-se que 85% da população mundial incorpora aos cuidados médicos o uso de plantas medicinais (OMS, UICN & WWF, 1993 citados por LEITE, I.A, et al., 2015). Plantas medicinais, de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são espécies vegetais, cultivadas ou não, que são utilizadas com fins terapêuticos e/ou profiláticos (ANVISA, 2018). Essas espécies são importantes para a pesquisa farmacológica, bem como para o desenvolvimento de novas drogas, por meio do uso direto de seus constituintes como agentes terapêuticos e, também, como matérias-primas de modelos para a síntese e produção de compostos farmacologicamente ativos (WHO, 1998).

As plantas, de modo geral, são capazes de sintetizar substâncias, designadas de metabólitos secundários, os quais são de grande importância na sua adaptação e propagação, proteção contra predadores, atratores voláteis, fornecimento de cor, dentre outros. Como exemplos de metabólitos secundários, temos os alcaloides, os terpenos e os flavonoides, sendo estes últimos representantes de uma classe química de larga representatividade no grupo de substâncias fenólicas de origem vegetal (DEWICK,

2002). Aos metabólitos secundários, várias atividades biológicas têm sido atribuídas caracterizando-os como compostos bioativos, inclusive do ponto de vista farmacológico. Os flavonoides, por exemplo, apresentam importantes e variadas atividades biológicas descritas em estudos, tais como: ações antitumorais, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antiparasitária e antiviral (COWAN, 1999; MIDDLETON et al., 2000; SIMÕES et al., 2004; COUTINHO et al., 2009.)

Os flavanoides, terpenos e alcaloides foram identificados em espécies vegetais da família Annonacea, dentre elas, *Annona crassiflora*. *A. crassiflora* é nativa do cerrado brasileiro e popularmente conhecida como Araticum. Considerando que muitas substâncias anti-inflamatórias são capazes de diminuir a produção ou bloquear a ação de mediadores algésicos, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina, pode-se inferir que os compostos referidos acima possuam ambas as atividades farmacológicas, analgesia e anti-inflamatória. Assim, o presente trabalho investigou os possíveis efeitos analgésicos do extrato aquoso liofilizado das folhas da *A. crassiflora* em modelos experimentais *in vivo*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Cerrado

Ocupando cerca de mais ou menos $\frac{1}{4}$ do território brasileiro, o Cerrado é o segundo maior bioma do país. Cerca de 30% de todas as espécies encontradas no Brasil estão presentes nesse bioma. Pesquisas mostram que somente em plantas há cerca de 11.000 espécies, já em relação à fauna, são 199 espécies encontradas de mamíferos e 837 espécies de aves. (ARRUDA & ALMEIDA, 2015 citados por ARRUDA, H. S et al., 2018). A alta diversidade na fauna e de árvores frutíferas, estas com elevado valor nutricional, propriedades medicinais e potencial uso pela indústria madeireira (RIBEIRO & RODRIGUES, 2006) tornam o Cerrado um bioma com alto potencial econômico (CARAMORI et al., 2004.). Os frutos de várias espécies do Cerrado apresentam alto teor de proteínas, vitaminas, sais minerais e açúcares, além do elevado valor nutritivo, essas frutas também apresentam características sensoriais importantes e ocupam um potencial econômico e alimentar importante para a população local (MALTA, 2011; ANGELLA, 2014 citado por AGUIAR, A.O, 2018). Segundo Gomes & Amâncio (1995), além dos frutos, o Cerrado apresenta uma gama de espécies vegetais que possuem um potencial oleaginoso, bem como de fornecer forragem, fibras, taninos, corantes e medicamentos.

Dentre as várias espécies de uso popular provenientes do Cerrado brasileiro, algumas pertencem à família Annonaceae, que se destaca por apresentar 2.500 espécies e 125 gêneros descritos até o momento, sendo no Brasil registrados 388 espécies e 29 dos 125 gêneros (CHATROU et al., 2004; MAAS et al., 2013 citados por ANSANTE, T.F, 2014).

2.2 *Annona crassiflora* Mart.

A espécie *Annona crassiflora* está distribuída em áreas de Cerrado nos estados da Bahia, Goiás, Ceará, Minas Gerais, Mato Grosso, São Paulo e Distrito Federal e pertence a uma grande família de plantas desse bioma, a família Annonaceae (SILVA et al., citado por FERREIRA, L.C et al., 2018)

A *Annona Crassiflora* é uma árvore hermafrodita xerofítica (consegue restringir a perda de água por meio de mecanismos anatomo-fisiológicos), heliófita (cresce a pleno sol), decídua ou caducifólia (perde as folhas durante parte do ano) e pode chegar a até 8 m de altura (LORENZI, 1998 citado por COTAL, L.G, et al. 2011,). O tronco pode variar de 20 a 30 centímetros de diâmetro, é revestido por casca áspera e corticosa. As folhas são alternas e simples (EGYDIO, 2009; ANGELLA, 2014 citato por AGUIAR, A.O, 2018). Suas flores nascem na junção entre o pecíolo das folhas e o caule e as pétalas são grossas e carnosas. As sementes são achatadas e elípticas de coloração amarronzada. Durante os meses de outubro e novembro, ocorre a florescência, enquanto no início de novembro e dezembro ocorre a frutificação com a maturação entre janeiro e abril. (EGYDIO, 2009; ANGELLA, 2014 citato por AGUIAR, A.O, 2018) Os frutos dessa planta, conhecidos como araticum, possuem formas tanto arredondadas quanto ovais, suas superfícies são recobertas com tomento e são de coloração esverdeada durante o desenvolvimento e amarronzada ao ficarem maduros. As dimensões variam de 9 a 15 cm de comprimento por 10 a 15 cm de diâmetro, pesando de 0,5 a 4,5 Kg. (ARRUDA & ALMEIDA, 2015 citado por ARRUDA, H.S et al., 2018). Seus frutos possuem sabor e aroma gradáveis e podem ser consumidos na forma de processados como licores, sorvetes, geleias e sucos, além da sua forma in natura (TELLES et al., 2003 citado por PIMENTA A.C et al., 2019).



Figura 1: *Annona crassiflora* / Araticum (Fonte: Canabrava, H.A. N., 2019).
Origem: Fazenda Santa Rita, Lassance, MG.

2.3 Atividades biológicas associadas à *Annona Crassiflora*.

A espécie *Annona crassiflora* tem sido bastante utilizada na medicina tradicional como antidiarreico, antitumoral, antirreumático, assim como para tratamento de doenças sexualmente transmissíveis (DST), picadas de cobras, doenças degenerativas e tratamento de feridas, além de controle e tratamento de piolhos. (DRAGANO et al., 2010 citado por ARRUDA H.S et al., 2018). Em um estudo feito por ROESLER et al., 2007, verificou-se que o extrato aquoso das folhas da planta, por inibir a secreção intestinal e/ou diminuir a absorção intestinal, demonstrou estimular e restaurar a motilidade gástrica e intestinal, além de inibir a ação do laxante preparado a partir do óleo de mamona e administrado por via oral (FERRAZ et al., 2017 citado por BARBOSA, P.C.O, 2018)

Além das atividades citadas acima, a partir do extrato etanólico das folhas e cascas do caule, foram isolados os alcaloides Anonaina, Lirodenina, Reticulina e Assimilobina,

os quais demonstraram que a espécie *A. Crassiflora* possui atividade analgésica, espasmolítica e limitada atividade antibacteriana. (HOCQUEMILLER et al., 1982 citado por CALVALCANTE, A.M, 2008).

Atividades antioxidante e de estabilidade oxidativa, foram observadas e atribuídas à presença de fitoesterol, bem como à composição de ácidos graxos presentes na semente do araticum e de substâncias encontradas na casca da referida planta. Verificou-se, ainda, que esses compostos promoveram a proteção hepática em ratos (ROESLER, 2011; LUIZA & JORGE, 2013). Estudo também demonstrou que frações derivadas da casca da *A. crassiflora* e enriquecidas com polifenóis se mostraram importantes na prevenção e nas terapias de desordens encontradas no fígado (ROESLER et al., 2007 citado por BARBOSA, P.C.O, 2018).

Além da sua ação hepatoprotetora, frações com polifenol, obtidas por partição líquido-líquido do extrato etanólico da casca da fruta e das folhas (PEF-Ac), demonstraram ação pró fibrogênica e anti-inflamatórias. Em modelos experimentais, o PEF-Ac diminuiu a infiltração de neutrófilos e macrófagos em feridas cutâneas e aumentou a reparação tecidual pelo favorecimento da síntese de colágeno, conseqüentemente, promovendo o fechamento de feridas e, produzindo, portanto, efeito cicatrizante (DE MOURA et al., 2018).

As propriedades analgésicas e anti-inflamatórias também foram avaliadas em estudo que utilizou as frações, precipitado (F1) e a fração solúvel (F2) do extrato hidroalcoólico das folhas da *A. crassiflora*, ambas enriquecidas em flavonoides, como demonstrado em análise fitoquímica, para tratar camundongos Swiss submetidos ao teste de nocicepção induzida por formalina. Ambas as frações, F1 e F2, diminuíram o tempo de lambida de pata na segunda fase do teste de nocicepção, efeito este que demonstrou ser dose-dependente com a fração F1. Entretanto, F1 e F2 não diminuíram o tempo de latência no teste do reflexo de retirada de cauda, no qual um estímulo térmico de intensidade superior a 40 °C é aplicado à cauda do camundongo. (OLIVEIRA et al., 2017).

Atividades antiproliferativas em células tumorais, como, por exemplo, o glioblastoma e a leucemia, foram demonstradas em modelos experimentais *in vitro* utilizando-se o extrato metanólico das folhas e o extrato das sementes da *A. crassiflora*. Além disto, tem sido relatado que uma fração rica em acetogenina obtida a partir do extrato etanólico da madeira possui atividade antitumoral e toxicidade em tumores de

Ehrlich (PIMENTA L, et al., 2011; FORMAGIO, A.S et al., 2015 citato por SILVA, V.A.O, et al., 2018).

Outras atividades biológicas importantes obtidas utilizando-se extratos da *A. crassiflora* incluem ações antimicrobianas. Extrato etanólico das folhas da referida espécie revelou atividade nematicida contra várias espécies de nematoides, dentre eles *Haemonchus* sp., *Bursaphelenchus* sp. e *Meloidogyne* sp. (ALAWA C.B.I et al., 2003 & FERREIRA L.E et al., 2013 citado por MACHADO, A.R.T, et al., 2015). Extratos etanólico e aquoso das folhas foram avaliados contra isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* spp de gado e demonstraram ser potentes bactericidas, sendo os flavonoides os principais metabólitos detectados nos extratos. (RIBEIRO, I.C.O et al., 2018).

Além dos seus efeitos antimicrobianos, derivados vegetais dessa espécie também podem ser utilizados como inseticidas, devido à presença de acetogeninas. Estas são metabólitos secundários derivados de ácidos graxos de cadeia longa e presentes em praticamente todas as partes da planta, sendo encontrados exclusivamente em espécies da família Annonaceae, dentre elas aquelas do gênero *Annona* (PAES, M.M, et al., 2016). As acetogeninas inibem o complexo I NADH (ubiquinona oxiredutase) e NADH oxidase na cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias e na membrana plasmática, respectivamente, em células dos insetos, causando a morte destes organismos, pelo desprovisionamento de ATP (JOHNSON et al., 2000 citado por ANSANTE, T.F, 2014).

Por fim, além de toda sua reconhecida importância biológica e seu potencial uso como ferramenta farmacológica e alimentícia, a espécie *A. crassiflora* também tem sido utilizada como importante fonte de matéria prima para a indústria de cosméticos e perfumaria (LUIZA & JORGE, 2013 citado por PIMENTA, A.C, 2017).

2.4 Metabólitos secundários

As atividades biológicas associadas à espécie *Annona crassiflora* têm sido atribuídas aos diferentes metabólitos secundários encontrados na referida espécie, tais como flavonoides, acetogeninas, alcaloides e terpenos.

2.4.1 Flavonoides

Os flavonoides pertencem ao grupo dos metabólitos secundários polifenólicos, substâncias naturalmente encontradas em grande variedade de plantas frutíferas e hortaliças (FALLER, A.L.K et al., 2009). Do ponto de vista químico, os polifenóis são ácidos fracos com uma ou mais hidroxilas ligadas a um ou mais anéis aromáticos

(KUMAR, N, et al., 2019). De modo semelhante, os flavonoides são compostos heterocíclicos oxigenados, com dois anéis aromáticos; podem ser encontrados ligados a açúcares (glicosídeos) ou em sua forma livre (aglicona) (KUMAR, S, et al., 2014 citado por FARZAEI, M.H et al., 2019).

Devido à extensa variação de combinações de grupos metil e hidroxil na estrutura básica dos flavonoides, além das inúmeras modificações, como adição ou redução, hidroxilação, metilação de grupos hidroxila ou do núcleo dos flavonoides, dimerização, glicosilação de grupos hidroxila ou em algum núcleo carbônico (HARBONE, 1984; YAO et al., 2004 citados por PEREIRA, R. J, et al.,2012) esses compostos são divididos em várias classes, incluindo antocianidinas, flavonas, flavanois, flavanonas, flavonols, isoflavonas e flavanas e já foram indicados mais de 8.000 tipos de flavonoides (FARZAEI, M. H, et al., 2019).

De modo geral, os flavonoides apresentam variados efeitos biológicos importantes, tais como atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral, redução da fragilidade e permeabilidade capilares, inibição da destruição do colágeno e da agregação plaquetária (FILHO et al., 2001; ARAÚJO, 2008). Estudo demonstrou que a atividade antioxidante se deve à estabilização de radicais livres e espécies reativas de oxigênio. Além disso, essa atividade normalmente aumenta com o aumento dos grupos hidroxilas e diminui com as reações de glicosilação (BALASUNDRAM et al., 2006). Na natureza, por serem bastante coloridos, os flavonoides atuam na atração dos insetos para a polinização das plantas (YAO et al., 2004).

2.4.2 Acetogeninas

As acetogeninas estão presentes em praticamente todas as partes das plantas, sendo uma substância exclusiva de espécies da família Annonaceae. São substâncias derivadas de ácidos graxos alifáticos de cadeia longa, com 32 a 34 átomos de carbono e um anel γ -lactônico terminal saturado ou insaturado. Podem ser encontrados de um a três anéis tetrahydrofuranos (THF) ou tetrahidropiranos (THP) em sua cadeia alifática, como também grupos funcionais oxigenados (cetonas, hidroxilas ou epóxidos) (ALALI et al., 1999 citado por PAES, M.M et al., 2016).

Estudos demonstraram que as acetogeninas possuem ação citotóxica em linhagens celulares tumorais, efeito associado à inibição da cadeia transportadora de elétrons em mitocôndrias. Ao longo da cadeia respiratória mitocondrial, o transporte de elétrons segue uma sequência de complexos de I ao IV (LENHINGER, 1995 citado por PAES,

M.M et al., 2016). O alvo da ação das acetogeninas está presente no complexo I (NADH: ubiquinona oxidorreductase), o qual envolve a transferência de elétrons do NADH à ubiquinona, processo este importante para a produção de energia nessas organelas. Dessa maneira, a inibição dessa enzima interfere na produção de ATP levando à morte celular programada, ou seja, à apoptose (JOHNSON et al., 2000 citado por PEREIRA, R. J, et al, 2012)

Além dessa importante atividade biológica, essa substância natural bioativa apresenta outras atividades, tais como: antiprotozoária, antimicrobiana, antitumoral, antimalárica e pesticida (ALALI; LIU; MCLAUGHLIN, 1999 citados por ANSANTE, T.F, 2014).

2.4.3 Alcaloides

Alcaloides são substâncias orgânicas cíclicas de caráter alcalino, devido a presença de pelo menos um átomo de nitrogênio no seu anel, o qual contém um par de elétrons não compartilhados (VIZZOTTO et al., 2010 citado por VIEIRA, I.C, 2014). Podem ser derivados de aminoácidos e, assim, são classificados de acordo com o aminoácido precursor (ornitina, lisina, tirosina, histidina, ácido nicotínico, ácido antranílico, triptofano) e de reações com aminas, ou também podem ser derivados de uma base nitrogenada, como, por exemplo, a cafeína (1, 3, 7 trimetilxantina), que é um alcaloide produzido a partir de uma purina (DEWICK, 2002; VIZZOTTO et al., 2010 citados por ANSANTE, T.F, 2014).

Esses compostos constituem cerca de 15% a 20% dos produtos naturais conhecidos, sendo estimado que esse grupo abranja mais de 4.000 compostos que estão divididos em diferentes grupos como quinolínico, piperidínico, tropânico, dentre outros. Um grupo que se destaca é o dos alcaloides indólicos, pois estudos mostram que têm uma grande diversidade em estruturas químicas e propriedades farmacológicas, sendo a principal, a atividade antineoplásica (VERPOORTE, 1986; CORDELL & QUINN-BEATTIE et al., 2001 citado por ANSANTE, T.F, 2014).

2.4.4 Terpenos

Os terpenos e seus derivados são metabólitos secundários comumente encontrados em óleos essenciais. As plantas, normalmente, armazenam seus óleos essenciais em compartimentos celulares específicos, tais como células secretoras e tricomas glandulares. A extração destes óleos pode ser feita por meio de diferentes métodos, a

partir de várias partes das plantas, como flores, folhas, galhos, hastes, madeira, sementes e raízes. Geralmente, os óleos essenciais são líquidos à temperatura ambiente, voláteis e solúveis em lipídios e em compostos inorgânicos menos densos que a água (MAHIZAN, N.A, et al, 2019; OUSSALAH, M, et al., citado por MAHIZAN, N.A, et al, 2019).

Do ponto de vista químico, estes metabólitos são hidrocarbonetos insaturados, cujas unidades básicas de construção são moléculas de isopreno (C₅H₈), podem ser cíclicos ou acíclicos, hidroxilados ou glicosilados. As ligações duplas carbono-carbono, conferem-lhes a definição de “alcenos naturais” (MC MURRY, 2011 citado por SOUZA, A.A et al., 2015). Os terpenos mais comumente encontrados são os monoterpenos e sesquiterpenos, os quais diferem no número de unidades isopreno (NAZZARO, F, et al., 2013 & SWAMY, M.K, et al., 2016 citados por MAHIZAN, N.A, et al, 2019).

Terpenoides são derivados de terpenos produzidos pela remoção ou adição de grupos funcionais, como, por exemplo, ácidos, álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, fenóis ou epóxidos terpênicos. Ainda que apresentando estruturas diferentes entre si, tanto os “alcenos naturais” como os terpenoides são constituídos por unidades de isopreno. Mentol, geraniol e citronela estão entre os terpenoides mais estudados. (ESCHENMOSER & ARIGONI, 2005; LOMMIS & CROTEU, 2014; MAHIZAN, N.A, et al, 2019).

Nas diferentes espécies vegetais, os terpenos e seus derivados são particularmente importantes nas interações planta – planta e plantas – insetos (KESSLER, A, et al., 2001 citado por HUANG, A.C, et al, 2018). Assim, podem também representar mecanismos de defesa da planta, evitando lesões promovidas por agentes externos (VIEGAS JUNIO, 2003 & CORREIA et al., 2008; citados por LORENA, O.F, et al, 2016).

Estudos também têm demonstrado a importância dos terpenos para o sistema cardiovascular, com efeitos vasodilatador, hipotensor e redução da frequência cardíaca (AYDINET al., 2007; MAGALHÃES et al., 2008; PEIXOTO NEVES et al., 2010; BASTOS et al., 2010; citados por SOUZA, A. A et al 2015).

Além do potencial como agentes com importantes ações farmacológicas, esses compostos são bastante utilizados na indústria cosmética, perfumaria e alimentícia, nesta última por melhorarem a qualidade sensorial dos alimentos (RAVINDRA & KULKARNI, 2015 citado por LORENA, O.F, et al, 2016).

2.5 Definição de dor nociceptiva e processo inflamatório.

Principais modelos de nociceção: Placa quente e Teste da formalina.

A percepção de estímulos nocivos é denominada de nociceção. Essa definição, por sua vez, não leva em consideração o componente emocional o qual, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), uma vez atrelado à transdução de estímulos nocivos do ambiente denomina-se “dor”, um conceito complexo e diferente de nociceção. O conceito de dor leva em consideração a sensação, a experiência, com influências pessoais e ambientais. Dessa maneira, em animais é utilizado o termo nociceção e não dor, já que esses não são capazes de expressar verbalmente os componentes subjetivos da dor. (JULIUS & BASBAUM. 2001; KENDEL et al., 2003 citados por SILVA, et al., 2013). Classificada de acordo com a duração do episódio, a dor pode ser denominada de aguda ou crônica. A dor aguda ocorre quando há ativação local de nociceptores, induzida por uma lesão tecidual, por exemplo, e pode desaparecer antes mesmo da reconstituição do tecido lesionado. A dor crônica ocorre quando a recuperação de uma doença ou lesão tecidual ultrapassa o tempo de recuperação do organismo. De acordo com o tipo de lesão e os mediadores envolvidos, a dor pode ser denominada como: neurogênica, quando o tecido neuronal é lesionado; psicogênica, a qual envolve fatores psicológicos; neuropática, quando existe disfunção de um nervo; ou nociceptiva quando um nociceptor é estimulado excessivamente. (MILLAN, 2002 citado por SILVA, J.C, et al., 2013).

Fibras mielinizadas (A δ) e fibras não mielinizadas (C) são responsáveis pela detecção de estímulos nocivos. (JULIUS & BASBAUM. 2001 citado por SILVA, et al., 2013). Responsivas a variações de temperatura e a intensos estímulos mecânicos, as fibras A δ são responsáveis pela dor aguda. Já as fibras do tipo C respondem a vários estímulos, como químicos, térmicos e mecânicos, sendo fibras nociceptores polimodais em sua maioria. (BASBAUM et al., 2009; KANDEL et al., 2014 citados por COUTO, A.C.G, 2019). Neurotransmissores diversos estimulam os nociceptores, por exemplo, acetilcolina, histamina, serotonina, leucotrienos, tromboxanos, neuropeptídeo Y, purinas, íons K⁺, bradicinina, prostaglandinas, citocinas (interleucinas e TNF- α), substância P, prótons (H⁺) e o glutamato (LUIZ, 2007 citado por SILVA, J.C, et al., 2013).

A dor nociceptiva é ativada por estimulação repetida, seja ela térmica, química ou mecânica ou pela presença de mediadores inflamatórios (prostaglandinas, por exemplo). Esse estímulo vai ocasionar uma modificação na cinética dos canais iônicos com consequente aumento da excitabilidade da membrana da fibra nociceptiva e diminuição

do limiar de iniciação de um potencial de ação no neurônio sensorial primário, denominando-se esse momento de hiperalgesia primária (CARVALHO et al, 2012).

Uma das causas da sensação de dor é a exposição do tecido ou órgão a algum agente potencialmente nocivo, seja ele físico (trauma, queimadura etc), químico (substâncias cáusticas) ou biológico (microrganismos, por exemplo). Esta exposição leva a uma resposta inflamatória, a qual desenvolve-se como um mecanismo reparador do tecido lesionado. Este processo envolve uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, dentre eles ativação enzimática, extravasamento de fluidos, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e reparação. (BECKER, E.L, 1983; PIPER, P, 1983 citados por CARVALHO, W.A, et al., 1998)

A partir do sítio da lesão celular, células inflamatórias, inicialmente macrófagos e leucócitos polimorfonucleares, são recrutadas e liberam citocinas (fase aguda da inflamação), dentre elas, as principais são, interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6) e fator α de necrose tumoral (TNF- α) (AKIRA, S, et al., 1990 citado por CARVALHO, W.A, et al., 1998). Os macrófagos, além de liberarem citocinas, também são responsáveis, juntamente com os neutrófilos e as células teciduais lesionadas, pela liberação de enzimas e substâncias oxidantes que ocasionam estresse oxidativo no local lesionado. Este estresse oxidativo, por sua vez, promove a liberação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio, as quais acabam por promover a indução de fatores transcricionais (NF- κ B, dímero fos-Jun e AP-1) que serão responsáveis pela atividade de reparo tecidual (colagenase, estromelina) (DRAY, A. et al., 1995; COOB, J.P, et al., 1996 citados por CARVALHO, W.A, et al., 1998).

Diferentes modelos animais de nocicepção são utilizados em pesquisas que investigam possíveis efeitos analgésicos de várias substâncias de origens natural, sintética ou semissintética. Dentre os modelos disponíveis, estão o teste da formalina e o teste da placa quente.

O teste da formalina consiste em provocar uma lesão tecidual por meio da injeção de um agente irritante, a formalina, em pata dianteira do animal. Em seguida, são avaliadas as reações associadas a manifestações nociceptivas, por exemplo, lambertura de pata (ABBOTT et al, 1995 citado por DE MELO et al., 2007). Este teste produz uma resposta bifásica. A fase inicial, que se dá pela ativação das fibras sensoriais do tipo C, descrita como dor neurogênica, ocorre imediatamente após a injeção da formalina na pata traseira do animal. Posteriormente, aproximadamente 15 minutos após a injeção da formalina, inicia-se a fase tardia. Esta fase é mais prolongada, sendo atribuída a uma

reação inflamatória com liberação de mediadores, dentre eles, o óxido nítrico. (ABBOTT et al., 1995; DAVIDSON et al., 1998 citado por DE MELO et al., 2007).

O teste da placa quente avalia o tempo que os animais demoram em responderem a estímulos térmicos (TITA et al., 2011 citado por SILVA, J.C et al., 2013). Os animais são colocados sobre uma superfície aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) (EDDY; LEIMBACH, 1953) e o tempo (em segundos) decorrido entre a colocação do animal sobre essa superfície e o aparecimento de reações nociceptivas, tais como, saltar ou morder, lambear, sacudir ou retirar as patas é registrado e referido como tempo de latência.

Alguns fármacos podem ser utilizados como controles positivos de hipoalgesia em ambos os modelos de estudo de nocicepção. No teste da placa quente, normalmente utiliza-se a morfina, um analgésico opioide; enquanto o anti-inflamatório não esteroidal (AINE) indometacina é utilizado no teste da formalina (ROCHA, J.L.C, et al., 2017; HOLANDA, V.A.D, et al., 2019; ISLAM, S, et al., 2019). Os opioides impedem a transmissão da nocicepção e o controle descendente da dor por meio da atuação no corno dorsal da medula espinhal (CARR, D.B, 1999 citado por COUTO, A.C.G, 2019); já os AINES apresentam ações anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), responsável pela produção de prostanoídeos.

3 JUSTIFICATIVA

A espécie *Annona crassiflora* contém flavonoides e outros metabólitos secundários com atividades biológicas diversas descritas na literatura, dentre elas, ações antioxidante, anti-inflamatória e analgésica. Contudo, ainda não foi avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas dessa importante espécie do Cerrado brasileiro. Considerando que muitas substâncias anti-inflamatórias são capazes de diminuir ou bloquear a produção e a ação de mediadores algésicos, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina, não é incomum encontrarmos drogas que possuam ambas as atividades farmacológicas, analgesia e anti-inflamatória. Assim, este projeto de pesquisa investigou possíveis efeitos analgésicos do extrato aquoso liofilizado das folhas da referida espécie. Foram utilizados os modelos experimentais *in vivo*: teste da placa quente e teste da formalina em camundongos BALB/C tratados ou não com o extrato aquoso da *A. crassiflora*. Este estudo forneceu subsídios preliminares para a compreensão acerca de possível ação analgésica da *A. crassiflora*.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade farmacológica analgésica do extrato aquoso das folhas da espécie *Annona crassiflora* (EAAC) em modelo experimental *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Preparar o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*.
- Avaliar potencial atividade analgésica por meio dos testes de nocicepção:
 - teste da formalina;
 - teste da placa quente.

5 METODOLOGIA

5.1 Local de Execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e nos Laboratórios de Experimentação Animal do Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

5.2 Material vegetal

Para a realização da pesquisa utilizando o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*, previamente, uma amostra da referida espécie foi coletada em campo de vegetação espontânea e, em seguida, identificada por biólogo qualificado. Posteriormente, uma exsicata (amostra prensada e dessecada) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (No de Registro: Número de Registro HUFU 73 547).

5.3 Obtenção do extrato aquoso

Para a preparação do extrato aquoso, as folhas da *A. crassiflora* foram coletadas em campos de vegetação espontânea em novembro/2018, na Fazenda Santa Rita em Lassance, MG, e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava. Após a colheita, as folhas foram separadas dos galhos, lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas

em liquidificador e o pó obtido foi colocado em proveta contendo água destilada na proporção de 10% (m/v), por 48 horas, à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi duplamente filtrado, inicialmente em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura - 20° C. Após congelamento, o extrato foi liofilizado à - 40 °C até a total remoção do conteúdo de água. O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer a - 20 °C até a data da utilização (FERRAZ et al., 2017)

5.4 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 20 a 30 g. Os animais foram fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU), onde foram mantidos até a data de realização dos experimentos, sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*.

Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU (PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 063/18).

5.5 Avaliação da atividade analgésica

Para a realização dos testes da placa quente ou da formalina, os animais foram divididos em quatro (G1 a G4) ou cinco grupos experimentais (G1 a G5), respectivamente. Em cada grupo experimental, os animais foram submetidos à restrição hídrica e alimentar por 30 minutos e foram pesados, separados e identificados na cauda por números. A medida da massa corporal de cada animal foi utilizada para o cálculo da massa média em cada grupo e da dose de cada substância a ser administrada por via oral, considerando-se a dose máxima igual a 1,0 ml/100 g animal.

O fármaco indometacina (anti-inflamatório não esteroideal – AINE) foi utilizado como controle positivo para o efeito de analgesia no teste da formalina (KOSTER et al., 1959). A solução de carboximetilcelulose (CBX) 0,5% foi utilizada como controle negativo em ambos os testes, da placa quente e da formalina.

A administração por via oral (v.o.) de indometacina, carboximetilcelulose (CBX; veículo) ou extrato aquoso da *Annona crassiflora* (EAAC) aos animais foi realizada por meio de cânula de gavagem específica para camundongos, a qual foi introduzida na boca

do animal e gentilmente conduzida até o estômago. O volume total administrado foi de 1,0 mL/100 g animal. As injeções intraplantares foram realizadas utilizando-se seringas para insulina (0,2 mL)

No teste da formalina, os grupos de animais receberam os seguintes tratamentos por via oral (v.o.),

G1: tratamento com solução de CBX 0,5% (controle negativo para analgesia);

G2: tratamento com indometacina (controle positivo para analgesia) solubilizada em CBX 0,5% (10 mg/kg);

G3, G4 e G5 tratamento com o EAAC nas concentrações 30, 55 e 100 mg/Kg, respectivamente, solubilizado em CBX 0,5%.

Já no teste da placa quente, a única diferença foi que não se utilizou a indometacina como controle positivo para analgesia, sendo, então, os animais divididos em 4 grupos:

G1: tratamento com solução de (CBX) 0,5%;

G2, G3 e G4: tratamento com o EAAC nas concentrações de 30, 55 e 100 mg/Kg, respectivamente, solubilizado em CBX 0,5%.

5.5.1 Teste da placa quente

No teste da placa quente, sessenta minutos após os tratamentos por v.o., a indução de hipoalgesia térmica nos animais tratados com o extrato em diferentes concentrações foi avaliada utilizando-se uma placa de alumínio aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) (EDDY; LEIMBACH, 1953) e quantificando-se o tempo de latência, ou seja, tempo, em segundos, para o animal exibir as primeiras reações de nocicepção (dor). Os animais [G1 (n=10); G2 (n=8); G3 (n=7) e G4 (n=6)] foram colocados individualmente sobre a placa aquecida e reações de saltos, lambedura, retirada ou sacudida das patas dos membros posteriores ou anteriores foram consideradas nocicepção. Após as primeiras manifestações, o animal era retirado da placa quente. As medidas do tempo de latência foram realizadas nos tempos zero (imediatamente após a gavagem), 30, 60 e 90 minutos após os tratamentos com o veículo e as concentrações dos extratos. O tempo máximo de permanência sobre a placa quente foi de 30 segundos para evitar danos teciduais.

5.5.2 Teste da formalina

A hipernocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina é um modelo utilizado para investigar hiperalgesia inflamatória em camundongos. Assim, utilizando

esse modelo de estudo, investigou-se um possível efeito analgésico do extrato aquoso da *A. crassiflora*. Após 60 minutos os tratamentos por v.o., os animais [G1 ao G5 (n=7)], em todos os grupos experimentais, receberam uma injeção intraplantar de formalina 2% (formaldeído em solução salina (NaCl 0,9%) estéril) na pata posterior direita (20 µl/pata). Em seguida, cada animal foi colocado individualmente no aparato campo aberto para a observação comportamental. Com o auxílio de cronômetros, foi registrado o tempo total que o animal apresentou reações indicativas de dor/comportamentos nociceptivos (lambadura, mordedura ou sacudida da pata injetada), nos intervalos de 0 a 15 minutos e de 15 a 30 minutos, após a injeção de formalina. Portanto, foram avaliadas as duas fases de dor: durante os primeiros 15 minutos (0 – 15 minutos, primeira fase: dor neurogênica) e no período de 15 a 30 minutos, correspondente à dor inflamatória (15 – 30 minutos, segunda fase: dor inflamatória) (HUNSKAAR et al., 1987).

5.6 Protocolo de eutanásia

A eutanásia foi realizada por deslocamento cervical em animais anestesiados com xilazina e cetamina (10 e 100 mg/kg, i.p., respectivamente).

5.7 Análise Estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados estão expressos como a média \pm S.E.M (erro padrão da média). Para as análises estatísticas, utilizou-se o teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov. No teste da placa quente, após verificação que as variáveis não exibiam distribuição normal, a comparação dos dados obtidos foi analisada pelo teste não paramétrico de Kurskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn. Já no teste da formalina, os dados obtidos apresentaram distribuição normal e foi utilizado o teste ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso da *Annona crassiflora* por meio do teste da placa quente

A possível indução de hipoalgesia térmica associada à *Annona crassiflora* foi avaliada por meio do teste da placa quente em camundongos BALB/c tratados por via

oral com o veículo CBX 0,5% ou com o EAAC nas concentrações 30, 55 e 100 mg/Kg. Os tempos de latência para manifestação das reações de nocicepção foram registrados em 0, 30, 60 e 90 minutos após os tratamentos.

Os tratamentos com as diferentes concentrações do extrato aquoso da *A. crassiflora* não induziram efeito de hipoalgesia térmica estatisticamente significativa nas condições experimentais utilizadas. Em cada grupo experimental, comparações entre os valores do tempo de latência obtidos nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$). De modo semelhante, as comparações entre os diferentes grupos de animais em cada tempo avaliado ($p > 0,05$). Para a análise estatística foi utilizado o teste de Kruskal-Wallis, seguido pelo pós-teste de Dunn ($p > 0,05$) (Figura 1).

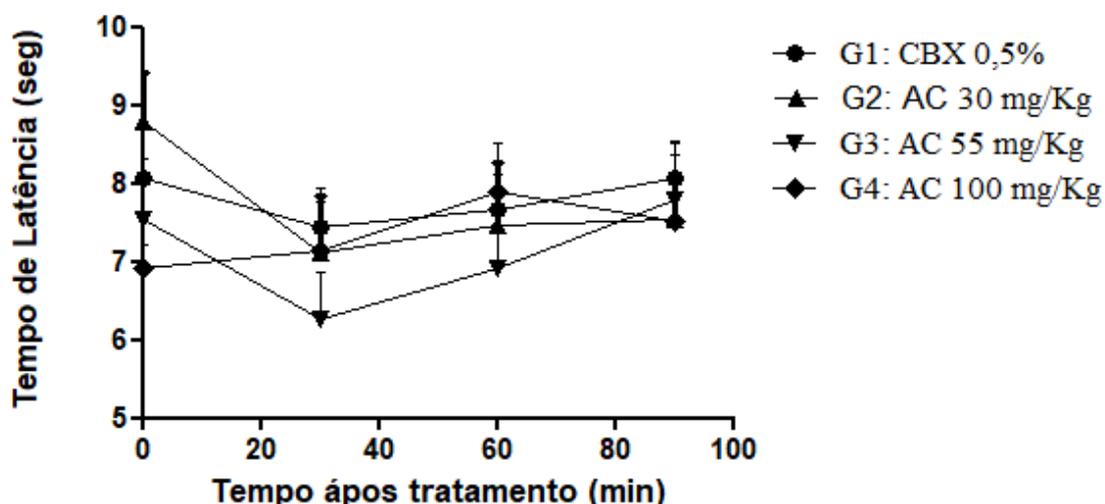


Figura 1. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na resposta nociceptiva de camundongos BALB/c avaliada por meio do teste da placa quente. Os animais foram tratados, por via oral, com o veículo carboximetilcelulose (CBX) 0,5% [G1 (n=10)]; ou com o extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora* nas concentrações 30 mg/Kg [G2 (n=8)], 55 mg/Kg [G3 (n=7)] e 100 mg/Kg [G4 (n=6)]. O tempo de latência corresponde ao tempo, em segundos, para o animal exibir as primeiras reações de nocicepção e foi avaliado em 0, 30, 60 e 90 minutos após os tratamentos. Os dados estão expressos como média \pm S.E.M. As comparações entre os tempos médios de latência nos diferentes grupos experimentais, em cada intervalo de tempo, foram analisadas utilizando-se o teste de Kurskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ($p > 0,05$).

6.2 Avaliação do potencial analgésico do extrato aquoso da *Annona crassiflora* por meio do teste da formalina

O possível efeito antinociceptivo do extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora* também foi avaliado por meio teste da formalina (Figuras 2A e 2B). O pré-tratamento dos animais com o extrato nas diferentes concentrações (30, 55, 100 mg/Kg) e, após 60 minutos, a injeção da formalina 2% induziram uma resposta bifásica de comportamentos nociceptivos. Na primeira fase, compreendida entre zero e 15 minutos após a injeção de formalina, correspondente à dor neurogênica, o tratamento com o extrato aquoso, em todas as concentrações utilizadas, produziu efeito antinociceptivo dose-independente comparado ao grupo controle negativo tratado com CBX 0,5% ($p < 0,01$), mas não em relação ao grupo controle positivo tratado com indometacina. Além disto, o AINE indometacina também não foi eficaz em reduzir comportamentos nociceptivos evocados pela administração da formalina (Figura 2A). Na segunda fase, entre 15 e 30 minutos de observação, correspondente à dor inflamatória, não foi evidenciada ação de hipoalgesia em todos os grupos tratados com o extrato ou indometacina, quando comparados ao controle CBX. Ao contrário, o grupo tratado com a maior concentração do extrato (100 mg/Kg) exibiu aumento estatisticamente significativo dos comportamentos nociceptivos em relação ao grupo controle CBX ($p < 0,01$) (Figura 2B).

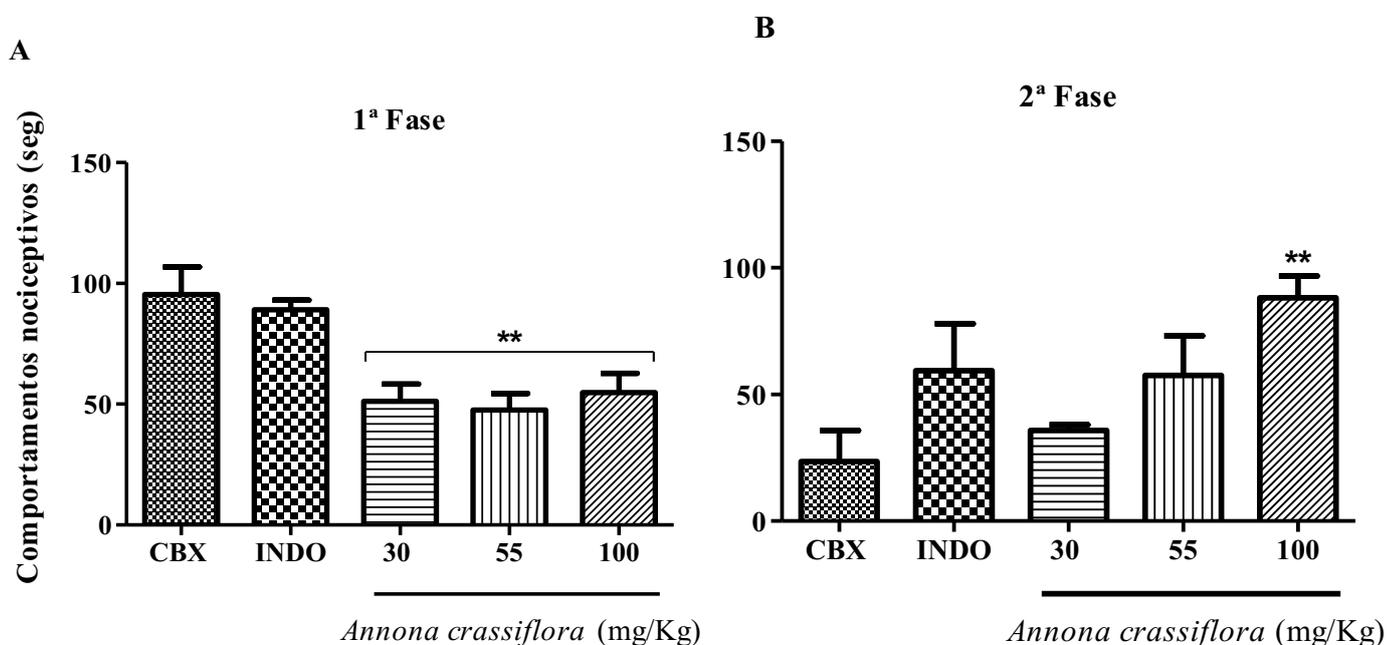


Figura 2. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na resposta nociceptiva de camundongos BALB/c avaliada por meio do teste da formalina. Os

animais foram divididos em 5 grupos ($n = 7$) e tratados, por via oral, com o veículo carboximetilcelulose (CBX) 0,5% (controle negativo); ou com o anti-inflamatório indometacina (INDO) (10 mg/Kg) (controle positivo); ou o extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora* nas concentrações 30 mg/Kg, 55 mg/Kg e 100 mg/Kg. Sessenta minutos após os tratamentos, os animais receberam uma injeção intraplantar de formalina 2% na pata posterior direita. Os comportamentos nociceptivos foram observados nos intervalos de 0 a 15 minutos (1ª Fase) e de 15 a 30 minutos (2ª Fase). Na 1ª Fase (A), o tratamento com o extrato reduziu, de modo estatisticamente significativo, os comportamentos nociceptivos, quando os grupos de animais tratados foram comparados ao grupo CBX. Na 2ª Fase (B), os tratamentos com o extrato ou com indometacina não reduziram os comportamentos nociceptivos. Ao contrário, o extrato, na maior concentração (100 mg/Kg), aumentou significativamente a nocicepção em relação ao grupo CBX. Os dados estão expressos como média \pm S.E.M. As comparações entre o grupo controle negativo e aqueles tratados com indometacina ou o extrato foram analisadas utilizando-se ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (** $p < 0,01$).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo, avaliamos o potencial efeito analgésico do extrato aquoso da espécie *Annona crassiflora*, por meio de dois modelos experimentais bem estabelecidos na literatura, os testes da placa quente e da formalina.

O modelo da placa quente avalia o tempo de latência que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) até apresentarem alguma reação de dor, seja ela lambida ou levantamento da pata (TITA et al., 2011 citado por SILVA, J.C et al., 2013). Estudos mostram que a atividade analgésica ocasionada pelo estímulo térmico no teste da placa quente é mediada por mecanismos centrais (AL-GHAMDI, M.S, 2001 citado por SILVA, M.G, et al., 2005). No teste da placa quente, a experiência nociceptiva é de curta duração, sendo inviável acessar com acuidade mecanismos moduladores que podem ser ativados por um estímulo.

SILVA et al. (2005) investigaram o potencial analgésico do extrato etanólico das folhas da *Conocliniopsis prasiifolia* (EECP) utilizando o modelo experimental da placa quente. Neste estudo, foram utilizados ratos Wistar machos albinos e camundongos Swiss machos albinos tratados com morfina 10 mg/kg (i.p), Tween-80 0,2% (0,1mL/10g), 100 mg/kg (i.p) e 500 mg/kg (v.o) de EECP. Após os tratamentos, os animais foram colocados sobre a placa metálica aquecida (50 ± 1 °C) e foi medido o tempo até o animal apresentar o comportamento instintivo de saltar sobre a placa ou lambe as patas. Os tempos de observação foram de 30, 60, 90 e 120 minutos. Os resultados do estudo mostraram que o

tempo de latência do animal sobre a placa quente nos tempos de observação de 60 e 90 min, aumentaram de forma significativa ($p < 0,05$) quando administradas ambas as doses de EECp, quando comparados aos grupos controles ($p < 0,01$); porém, os maiores tempos de permanência na placa quente continuaram sendo dos animais que receberam morfina 10 mg/kg (i.p). Tal estudo sugeriu, então, que o EECp possui efeito analgésico de ação central, já que o bloqueio das respostas provocadas por estímulos térmicos indica um mecanismo de ação central. (LORO, J.F, et al., 1999; RAMENZANI, M, et al, 2001 citados por SILVA, M.G, et al., 2005).

Em nosso estudo, o teste da placa quente revelou ausência de efeito antinociceptivo no EAAC, sugerindo que nas condições experimentais utilizadas, a *A. crassiflora* parece não ter efeito de hipoalgesia mediado por ação central. Alguns fatores podem explicar o resultado obtido, tais como, a ausência de substâncias ativas no EAAC; ou presença de substâncias ativas no EAAC, porém com baixa biodisponibilidade oral; variabilidade individual nos grupos animais, tornando os dados obtidos insignificantes do ponto de vista estatístico.

As respostas nociceptivas causadas pela formalina em roedores são claramente bifásicas, sendo divididas em uma primeira fase, que ocorre durante os 5 minutos iniciais e, uma segunda fase, que acontece entre 15 e 30 minutos após a injeção com formalina. A primeira fase é descrita como neurogênica e parece estar relacionada com a ativação direta de fibras sensoriais do tipo C. Por outro lado, a segunda fase possui um caráter mais prolongado, sendo atribuída à liberação de mediadores inflamatórios (CARLINI; MENDES, 2011). Em nosso estudo, o EAAC mostrou efeito antinociceptivo somente na primeira fase do teste da formalina. Estes dados corroboram, pelo menos em parte, com aqueles obtidos por outros autores, utilizando modelos experimentais distintos.

O efeito antinociceptivo da *A. crassiflora* foi investigado utilizando-se uma fração diclorometano, obtida da casca do fruto da referida espécie, na dor induzida por cinamaldeído. Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos tratados por via oral (v.o) 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 (n = 6). O grupo controle (n = 5) não recebeu nenhum tratamento, apenas a injeção de cinamaldeído. Após a injeção de cinamaldeído, os animais foram observados durante 30 minutos em uma câmara de vidro. Os resultados do trabalho mostraram que houve uma diminuição de 56% da resposta de lambida de pata quando os animais foram submetidos ao tratamento com fração diclorometano na dose de 30 km/kg comparados ao grupo controle, sugerindo

efeito de analgesia à fração diclorometano. Estudos indicam que a fração diclorometano, obtida do extrato etanólico é rica em alcaloides, sendo estas substâncias com inúmeros efeitos e atividades terapêuticas, dentre elas a atividade analgésica. (COUTO, A.C.G., 2019). Além da avaliação do efeito antinociceptivo da fração diclorometano, obtido da casca do fruto da planta *Annona crassiflora Mart* na dor induzida por cinamaldeído, os autores também avaliaram o efeito antinociceptivo na dor induzida por formalina. Foram usados camundongos C57BL/6 machos (n = 6) pré-tratados por via oral, com o extrato etanólico (30, 100 e 300 mg/kg), 1h antes da injeção intraplantar de formalina (solução 2,5%; 10 µL) na superfície plantar da pata traseira direita. O grupo controle recebeu apenas injeção de formalina e o grupo veículo foi tratado com 200 µl de DMSO 10%, por via oral (veículo para a diluição do extrato). Logo após a injeção intraplantar de formalina, os animais foram observados durante 30 minutos em uma câmara de vidro. Foi cronometrado o tempo durante a reação de lambida e *shaking* da pata injetada e foram avaliados os resultados nos tempos de 0-5 e de 15-30 minutos. O teste da formalina também foi usado para avaliar o efeito da fração de diclorometano nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, sendo 4, 9 e 9 animais usados, respectivamente, para cada concentração. O resultado do trabalho mostrou que uma resposta antinociceptiva foi produzida na fase neurogênica (primeiros 5 minutos) e na fase inflamatória (15-30 minutos) quando utilizado o extrato etanólico na concentração de 30 mg/Kg. Em relação aos extratos na concentração de 100 e 300 mg/Kg não houve redução significativa da analgesia nos primeiros 5 minutos, mas quando avaliada na segunda fase (fase inflamatória), o extrato na concentração de 100 mg/Kg apresentou uma redução da resposta. Já os resultados encontrados em relação à fração diclorometano, nos primeiros 5 minutos, na concentração de 30 mg/Kg, houve uma redução na resposta de lambida de pata em relação ao grupo controle e na segunda fase (fase inflamatória), na mesma concentração, houve uma diminuição na resposta. Os tratamentos de 10 e 100 mg/Kg não obtiveram uma redução significativa em ambas as fases.

Em nosso estudo, a ausência de efeito antinociceptivo na segunda fase do teste da formalina pode ser atribuída ao início tardio para cronometrar esta fase (15 após a injeção de formalina até 30 minutos), haja vista que no estudo descrito acima, a mesma foi iniciada após 5 minutos; a utilização de linhagens diferentes de animais também pode levar a diferenças nas respostas obtidas. Em nosso estudo, comparando-se os resultados obtidos nos testes da placa quente e da formalina, a ausência de efeito antinociceptivo na

placa quente, sugerindo que o EAAC não possui efeito de analgesia central, e, por outro lado, a observação de hipoalgesia induzida pelo extrato na primeira fase do teste da formalina, sugerindo estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ , reforçam a necessidade de reduzir o intervalo de tempo na primeira fase do teste da formalina para avaliarmos se, de fato, não existe efeito de analgesia central, bem como efeito sobre a produção de mediadores inflamatórios, normalmente observado na segunda fase do teste da formalina.

A formalina pode agir como um ativador de receptores do tipo TRPA1, quando em concentrações menores que 1% e, em concentrações maiores, atua sobre vias alternativas, desencadeadas por mecanismos anti-inflamatórios que não envolvem a ativação desses receptores TRPA1. Os receptores TRPA1 encontram-se colocalizados com os receptores TRPV1 em uma subpopulação de fibras sensoriais chamadas de fibras A δ ou fibras do tipo C (MCNAMARA et al., 2007; SHIELDS et al., 2010, citados por SANTOS, G.T, 2013; BASBAUM et al., 2009).

Desta maneira, este estudo não evidenciou a possível ação analgésica do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* no teste de placa quente, mas este efeito foi detectado na primeira fase (fase neurogênica) do teste de formalina. Portanto, os resultados obtidos sugerem que o EAAC possui propriedades analgésicas, como observado em outros estudos utilizando diferentes derivados vegetais da referida espécie. Portanto, novos experimentos deverão ser realizados para a confirmação do efeito analgésico observado, bem como para elucidar os mecanismos envolvidos. Para tanto, poder-se-á utilizar maior número amostral ou, até mesmo, outras espécies animais, como ratos, ao invés de camundongos. Da mesma forma, outros modelos de indução de dor podem ser incluídos, como, por exemplo, os testes de contorções abdominais (WHITTLE, 1964 citado por SILVA et al., 2013), Randall-Selitto (RANDALL & SELITO, 1957 citado por SILVA et al., 2013), retirada de cauda (OLIVEIRA et al., citado por SILVA et al., 2013), dentre outros.

8 CONCLUSÕES

- No teste de placa quente, todas as substâncias utilizadas, tanto o veículo (carboximetilcelulose 0,5%), quanto as diferentes concentrações do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (30, 55 e 100mg/Kg), não demonstraram ter efeito antinociceptivo.

- No método de indução de dor induzida por formalina 2%, todas as concentrações utilizadas do extrato aquoso de *Annona crassiflora* foram eficazes quanto à diminuição da resposta nociceptiva do animal na primeira fase do teste (fase neurogênica).
- No método de indução de dor induzido por formalina 2%, os extratos em suas diferentes concentrações não demonstraram efeito antinociceptivo estatisticamente significativo na segunda fase do teste (fase anti-inflamatória).

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Formulário de Fitoterápicos Farmacopeia Brasileira**. 1ª edição. Primeiro Suplemento. 2018.

AGUIAR, A.O. **Processamento e aproveitamento do fruto do araticum (*Annona Crassiflora* Mart.) em forma de doce em massa**. Palmas, p. 54, 2018 Dissertação, 2018.

ANSANTE, T.F. **Metabólitos secundários de Annonaceae: triagem, fracionamento biomonitorado e bioatividade frente a *Spodoptera frugiperda* (J.E.Smith, 1797) (Lepidoptera 2014)**. Piracicaba, p. 103, 2014 Dissertação, 2014.

APARECIDO, V.A. **Estudo da Atividade Farmacológica Anti-inflamatória do Extrato de *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) DC em modelo experimental in vivo**. Uberlândia, p. 17, 2018. Trabalho de conclusão de curso, 2018.

ARRUDA, H. S; PEREIRA, G. A; MORAIS, D.R; EBERLIN M.N; PASTORE, G.M. **Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS**. Food Chemistry, v. 245, p. 738-749, 15 April 2018.

ARRUDA, H.S; PEREIRA, G.A; PASTORE, G.M. **Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a potential source of natural antioxidant compounds**. International Food Research Journal. 2018

ARRUDA, H.S; FERNANDER, R.V. B; BOTREL, D.A; ALMEIDA, M.E.F. **Cerrado fruits: knowledge and acceptance of *Annona Crassiflora* Mart. (Araticum) and *Eugenia dysenterica* Mart. (Cagaita) for children using the senses of taste and vision**. J. Health Biol Sci, v.3, n. 4. 2015.

BAILÃO, E.F; DEVILLA, I.A; CONCEIÇÃO, E.G; BORGES, L.L. **“Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits”**. International Journal of Molecular Sciences v. 16, 10. 9 Oct. 2015.

BARBOSA, P.C.O. **ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Annona crassiflora* EM MODELO EXPERIMENTAL in vivo.** Uberlândia, 2018. Conclusão de curso. 2018.

BASBAUM, A. I. et al. **Cellular and molecular mechanisms of pain.** *Cell*, v. 139, p. 267-284. 2009.

BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS: Série B. Textos Básicos de Saúde.** Brasília – DF, 60 p. 2006

CALVALCANTE, A.M. **Avaliação da atividade antimicrobiana da *Annona crassiflora* Mart frente a microrganismos da microflora endodôntica.** Maceió, p. 136, 2008. Tese (Doutorado em Química e Biotecnologia). 2008.

CARLINI, E. L. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental.** Editora Fap-UNIFESP, 2011.

CARVALHO, R.T; PARSONS, H.A. **Manual de Cuidados Paliativos ANCP.** Ampliado e atualizado. 2ª edição. 2012.

CARVALHO, W.A; LEMÔNICA, L. **Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos.** Revista Brasileira de Anestesiologia 137. Vol. 48, Nº 2, Março - Abril, 1998

COSTA, G.P. **Estudo da atividade antioxidante de folhas e polpa de *Annona crassiflora* Mart. para utilizar como fitocosmético.** Assis, p. 52, 2017. Dissertação, 2017.

COTAL, L.G; VIEIRA, F.A; MELO JUNIOR, A.F; BRANDÃO, M.M; SANTANA, K.N.O; GUEDES, M.L; OLIVEIRAL, D.A. **Genetic diversity of *Annona crassiflora* (Annonaceae) in northern Minas Gerais State.** Genetics and Molecular Research, v. 10-3, p. 9. 2011.

COUTO, A.C.G. **Investigação do possível efeito antinociceptivo do extrato etanólico e da fração diclorometano obtidos da planta *Annona crassiflora* Mart.** Monografia. Uberlândia. 2019.

DE MELO, J.O; ENDO, T.H; AMADO, L.E.B; SVIDZINSKI, A.E; BARONI, S; DE MELLO, J.C.P; AMADO, C.A.B. **Efeito da casca de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) em modelos de nocicepção animais.** Rev. Bras. Cienc. Farm. vol.43 no.3 São Paulo Julho - Setembro. 2007

DE MOURA, F.B.R; JUSTINO, A.B; FERREIRA, A.B; ESPINDOLA, F.S; ARAÚJO, F.A; TOMIOSSO, T.C. **Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair.** *Planta Med* © Georg Thieme Verlag KG Stuttgart. Setembro, 2018.

FALLER, A.L.K; FIALHO, E. **Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil.** Revista Saúde Pública 2009.

FARZAEI, M.H; SINGH, A.K; KUMAR, R; CROLEY, C.R; PANDEY, A.K; CORY-BARRERA, E; PATRA, J.K; DAS, G; KERRY, R.G; ANNUNZIATA, G; TENORE, G.C; KHAN, H; MICUCCI, M; BUDRIESI, R; MOMTAZ, S; NABAVI, S.M; BISHAYEE, A. **Targeting Inflammation by Flavonoids: Novel Therapeutic Strategy for Metabolic Disorders.** International Journal of Molecular Sciences. Outubro, 2019.

FELIPE, L.O; BICAS, J.L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais.** Quím. Nova esc. V. 39, n. 2, p. 120-130. Maio, 2017.

FERRAZ, C.R; SILVA, D.B; PRADO, L.C.S; CANABRAVA, H.A.N; SILVA, B.B. **Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of Annona crassiflora (Annonaceae).** Natural Product Research. Novembro. 2017.

FERREIRA, LC; BISPO, N.S. **Escarificação mecânica, tratamento térmico e ácido giberélico na superação de dormência de sementes de Annona crassiflora MART.** Caderno de Ciências Agrárias, [S.1], v.10, n.1, p. 13-17. Jul, 2018.

FIGUEREDO, C.A; GURGEL, I.G.D; JUNIOR, G.D.G. **A Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos: construção, perspectiva e desafios.** Physis Revista de Saúde Coletiva, Rio de Janeiro. 2014

FIRMO, W.C.A; MENEZES, V.J.M; PASSOS, C.E.C; DIAS, C.N; ALVES, L.P.L; DIAS, I.C.L; NETO, M.S; OLEA, R.S.G. **CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS.** Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011

FORMAGIO, A.S.N; VIEIRA, M.C; CARVALHO, J.E. **“In Vitro Biological Screening of the Anticholinesterase and Antiproliferative Activities of Medicinal Plants Belonging to Annonaceae.”** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. v. 48. 2015, April.

HUANG, A.C; OSBOURN, A. **Plant terpenes that mediate below-ground interactions: prospects for bioengineering terpenoids for plant protection.** Pest Management Science. V. 75, n.9, p.20. Setembro, 2019.

HOLANDA, V.D; OLIVEIRA, M.C; SOUZA, L.S; LOBÃO-SOARES, B; ANDRÉ, E; JUNIOR, E.D.S; GUERRINI, R; GALO, G; RUZZA, C; GAVIOLI, E.C. **Dopamine D1 and D2 receptors mediate neuropeptide S-induced antinociception in the mouse formalin test,** European Journal of Pharmacology. 2019.

ISLAM, S; SHAJIN, S; RASHID, R.B; KHAN, M.F; AL-MANSUR, A; DATTA, B. K; RASHID, M.A. **Antinociceptive activities of Artocarpus lacucha Buch-ham (Moraceae) and its isolated phenolic compound, catechin, in mice.** BMC Complementary and Alternative Medicine. 2019

KRINSKI, D; MASSAROLI, A; MACHADO, M. **Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae.** Rev. Bras. Frutic. Jaboticabal, v. 36, n. spe1, p. 225-242. 2014.

KUMAR, N; GOEL, N. **Phenolic acids: Natural versatile molecules with promising therapeutic applications**. Biotechnology Reports. 2019

LAGE, G.A. **ISOLAMENTO, IDENTIFICAÇÃO QUÍMICA E BIOPROSPECÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS NAS FOLHAS ANNONA CRASSIFLORA Mart.** Belo Horizonte, 2011. p. 108. Dissertação, 2011.

LEITE, I.A; MORAIS, A.M; SILVA DO Ó, K.D; CARNEIRO, R.G; LEITE, C.A. **A ETNOBOTÂNICA DE PLANTAS MEDICINAIS NO MUNICÍPIO DE SÃO JOSÉ DE ESPINHARAS, PARAIBA, BRASIL**. Biodiversidade, v.14, n.1, p.24. 2015.

MACHADO, A.R.T; FERREIRA, S.R; PIMENTA, L.P.S. **“Nematicidal Activity of *Annona Crassiflora* Leaf Extract on *Caenorhabditis Elegans*”**. Parasites & Vectors. v.8-113, p. 16. 19-Feb-2015.

MAHIZAN, N.A; YANG, SK, MOO, CL; SONG, A.AL; CHONG, CM; CHONG, CW; ABUSHELAIBI, A; LIM, SH, E; LAI, KS. **Terpene Derivatives as a Potential Agent against Antimicrobial Resistance (AMR) Pathogens**. Jornal List, Molecules, v. 24. Julho, 2019.

MARQUES, JP; LOPES, GC. **ALCALOIDES COMO AGENTES ANTITUMORAIS: CONSIDERAÇÕES QUÍMICAS E BIOLÓGICAS**. Revista UNINGÁ Review. v.24, n.1, p.56-61. Out – Dez, 2015.

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.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Brasília – DF, 2006.

OLIVEIRA, L. S; MUZITANO, M. F; COUTINHO, M. A. S; MELO, G. O; COSTA, S. S. **Plantas Medicinais como Recurso Terapêutico em Comunidade do Entorno da Reserva Biológica do Tinguá, RJ, Brasil – Metabólitos Secundários e Aspectos Farmacológicos**. *Revista Científica Internacional*. Ano 4, n. 17. Abril /Junho – 2011.

OLIVEIRA, C.C; MATOS, N.A, VELOSO, C.C; LAGE, G.A; PIMENTA, L.P.S; DUARTE, I.D.G; ROMERO, T.R.L; KLEIN, A; PEREZ, A.C. **Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice**. p. 16. 25 January 2018.

PAES, M. M.; VEGA, M. R. G.; CORTES, D.; KANASHIRO, M. M. **Potencial Citotóxico das Acetogeninas do Gênero *Annona***. Rev. Virtual Quim., 2016, 8 (3), 945-980. Data de publicação na Web: 26 de abril de 2016

PEREIRA, R. J; CARDOSO, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes**. v. 3, n. 4, p. 146-152. Nov, 2012.

PIMENTA, A.C; AMANO, E; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C. **Estaquia e anatomia caulinar de *Annona crassiflora* Mart.** Caderno de Ciências Agrárias [S.I], v. 9, n.2, p. 1-7. Ago, 2017.

PIMENTA, A.C; ZUFFELLATO-RIBAS, K.C; PANOBIANCO, M; KOEHLER, H.S. **GIBERELINA NA SUPERAÇÃO DE DORMÊNCIA DE SEMENTES DE ARATICUNZEIRO (*Annona crassiflora* MART. – ANNONACEAE).** Gl. Sci Technol, Rio Verde, v.12, n.02, p.79-86, mai/ago. 2019.

RAHMAN, I.U; AFZAL, A; IQBAL, Z; IJAZ, F; ALI, N; SHAH, M; ULLAH, S; BUSSMANN, R.W. **Historical perspectives of ethnobotany.** Clinics in Dermatology, p.7. 2019.

RIBEIRO, I.C.O; MARIANO, E.G.A; DUARTE, E.R. **Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle.** BMC veterinary research. v. 14,1 32. 30 Jan. 2018.

ROCHA, J.A; BOSCOLO, O.H; FERNANDES, L.R.R.M.V. **Etnobotânica: um instrumento para valorização e identificação de potenciais de proteção do conhecimento tradicional.** Campo Grande, v. 16, n. 1, p. 67-74, jan./jun. 2015.

ROCHA, J.L.C; CALUMBY, R.F.A.T; SILVA, D.F; BRANDÃO, H.N; VILLARREAL, C.F; LIMA, F.O. **Evaluation of Biological Activity of *Polygala Boliviensis* in Experimental Models.** Iranian Journal of Pharmaceutical Research. 2019.

SANTOS, G.T. **PARTICIPAÇÃO DOS RECEPTORES TRPPAPPP1 EM MODELOS DE ATAQUE AGUDO DE GOTA EM ROEDORES.** Trabalho de Tese de doutorado. Santa Maria, RS. 2013.

SANTOS, L.A.R.; PIMENTA, L.P.S.; BOAVENTURA, M.A.D. **Acetogeninas de anonáceas bioativas isoladas das sementes de *Annona cornifolia* A. St – Hi.** Article in Revista Brasileira de Plantas Mediciniais · September 2007.

SILVA, J.V; SARAIVA, S.R.G. L; JUNIOR, R.G.O; ALMEIDA, J.R.G.S. **Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão.** Rev. Bras. Farm. 2013.

SILVA, V.A.O; ALVES. AL. V; ROSAL, M.N; SILVA, L.R.V; MELENDEZ, M.E; CURY, F.P; GOMES, I.N.F; TANSINIL, A; LONGATO, G.B; MARTINHO, O; OLIVEIRA, B.G; PINTO, F.E; ROSY, W.R; RIBEIRO, I. M. A; REIS, R.M. **Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines.** p. 1-14. 2018 Aug 29.

SILVA, E.A.A; MELO, D.L.B; HILHORST, H.W.M. **“Germination Ecophysiology of *Annona Crassiflora* Seeds.”** Annals of Botany. v. 99,5, p. 19. 2007, May.

SOUZA, A. A; RODRIGUES, S.A; MENEZES FILHO, J.E.R; VASCONCELOS, C.R; SERAFINI, M.R; QUINTANS-JÚNIOR, L.J; ESTEVAM, C.S. **Terpenos com aplicação cardiovascular.** Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias, São Cristóvão, v. 5, n. 2. abril - junho. 2015.

VÁSQUEZ, S. P. F; MENDONÇA, M. S; NODA, S. N. **Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil.** Acta Amaz. v.44, n.4. Dez, 2014.

VIEIRA, R.F; CAMILLO, J; CORADIN, L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial - Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste.** Ministério do Meio Ambiente. Secretaria de Biodiversidade. Departamento de Conservação e Manejo de Espécies. Brasília – DF, 2016.

VILAR, J.B.; FERRI, P.H.; CHEN-CHEN, L. **Genotoxicity investigation of araticum(*Annona crassiflora* Mart., 1841, Annonaceae) using SOS-Inductest and Ames test.** Braz. J. Biol. v. 71, n. 1, p. 197-202. Feb. 2011.