

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

Victor Ferreira Costa

**Atividade antinociceptiva do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* (cagaita)
em modelo experimental *in vivo*.**

Uberlândia/MG

2019

Victor Ferreira Costa

**Atividade antinociceptiva do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* (cagaita)
em modelo experimental *in vivo*.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Graduação em Biomedicina do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (GBD039) e obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

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

Uberlândia/MG

2019

Victor Ferreira Costa

**Atividade antinociceptiva do extrato aquoso das folhas de *Eugenia dysenterica* (cagaita)
em modelo experimental *in vivo*.**

Trabalho de Conclusão de Curso aprovado
para a aprovação na disciplina de Trabalho de
Conclusão de Curso II e obtenção do título de
Bacharel em Biomedicina pela Universidade
Federal de Uberlândia (MG) pela banca
examinadora formada por:

Uberlândia, 06 de dezembro de 2019.

Banca examinadora:

Prof. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves (UFU/MG)
Orientadora

Prof. Dr. Tarciso Tadeu Miguel (UFU/MG)
Membro

Prof. Dr. Rodrigo Molini Leão (UFU/MG)
Membro

Agradecimentos

Primeiramente à minha mãe por apoiar e deixar seu único filho cursar uma faculdade a quase 1000 quilômetros de casa.

Aos professores do Departamento de Farmacologia do ICBIM/UFU, principalmente a Professora Celene e o Professor Luiz, que me ensinaram e me incentivaram por todos esses anos.

À Amanda, Luiz Paulo e Gustavo que estiveram ao meu lado em muitos momentos de dificuldade e indecisão sobre a permanência no mundo acadêmico.

Às duas baterias que tive a honra de fazer parte e tive o prazer de fazer amigos que vão estar comigo para sempre.

À Rede de Biotérios de Roedores da Universidade Federal de Uberlândia (REBIR-UFU) pelo fornecimento dos animais e local adequado para a realização dos experimentos.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio ao desenvolvimento deste trabalho (DIRPE/PIVIC Nº 865/2018).

Por fim, a todos os animais que participaram deste estudo.

Resumo

A espécie *Eugenia dysenterica*, nativa do Cerrado brasileiro e popularmente conhecida como cagaita, é uma árvore de porte mediano com grande utilização no ramo alimentício e na medicina tradicional. Vários estudos têm descrito propriedades biológicas em derivados preparados a partir das folhas da referida espécie. O óleo essencial demonstrou atividade antidiarreica e efeito cicatrizante; o extrato aquoso apresentou atividades anticolinesterásica e gastroprotetora. Análises fotoquímicas de derivados da referida espécie apontaram a presença de metabólitos secundários, dentre eles, flavonoides, catequinas e taninos, aos quais foram atribuídas atividades anti-inflamatória e analgésica. Considerando que esses compostos bioativos possuem ações anti-inflamatórias e que não é incomum encontrarmos drogas que possuam ambas as atividades farmacológicas, antinociceptiva e anti-inflamatória, o objetivo deste projeto foi investigar possível ação antinociceptiva no extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*. O extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica* (EAED) foi preparado a partir das folhas secas e trituradas, misturadas com água destilada na proporção de 20% (m/v). O efeito de analgesia foi avaliado por meio dos testes de contorções abdominais e da placa quente em camundongos Balb/C. Os animais foram divididos em cinco grupos (n= 6 a 7/grupo) e tratados, por via oral, com EAED (100, 550, 1000 mg/Kg), ou indometacina (10 mg/Kg) solubilizados em carboximetilcelulose 0,5% (CBX 0,5%), ou somente com o veículo CBX 0,5%. Os dados obtidos foram expressos como média $\pm$ E.P.M. e as comparações entre as médias dos diferentes grupos experimentais foram analisadas utilizando-se ANOVA, seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (*p < 0,05). Os resultados obtidos mostraram que o EAED reduziu o número de contorções abdominais nas maiores doses, 550 e 1000 mg/Kg, em 51,5% e 54,5%, respectivamente, comparado ao grupo controle que recebeu apenas CBX 0,5%. O anti-inflamatório indometacina também reduziu em 59,2% o número de contorções abdominais após o estímulo com ácido acético. No entanto, no teste da placa quente não houve diferença estatística entre os grupos experimentais, em todos os tempos analisados. Portanto, os dados sugerem que o extrato avaliado possui potencial ação antinociceptiva em modelo experimental de dor aguda, induzida por agente químico, o qual pode estar relacionado aos metabólitos secundários identificados nessa espécie.

Palavras-chave: antinociceptivo; Myrtaceae; *Eugenia dysenterica*; contorções abdominais; medicina popular

Abstract

Eugenia dysenterica also known as cagaita is a native species from Brazilian Cerrado; it has a medium size and frequently used in food industry. However some studies described biological activities in products from its' leaves. The essential oil showed anti-diarrheal and wound healing effects; the aqueous extract showed anti-cholinesterase and gastroprotective effects. Some studies analyzed the phytochemical content of the products from *E. dysenterica* and they related the presence of secondary metabolites, mainly flavonoids and tannins which anti-inflammatory and analgesic activities has been described. Whereas compounds with biological activities described in *E. dysenterica* show anti-inflammatory effect and that some substances have properties, analgesic and anti-inflammatory, the aim of this study was to evaluate the antinociceptive effect of the aqueous extract of the leaves from *E. dysenterica* (EAED). The extract was prepared after the leaves were dried and pounded, the powder was mixed with distilled water with the proportion of 20% (m/v). The antinociceptive effect was measured using the hot plate test or the abdominal writhing test in Balb/c mice. The mice were divided in five groups (n= 6 or 7/group) and orally treated with three doses of the EAED (100, 550 or 1000 mg/Kg) or indomethacin (10 mg/Kg) diluted in carboxymethyl cellulose 0.5% (CBX 0.5%), or just CBX 0.5%. The statistical analysis was made using ANOVA followed by Bonferroni post-test considered statistic significant when $p < 0.05$, the data were analyzed as mean $\pm$ S.E.M. Our results in the abdominal writhing test reveal that the extract in the two higher doses (550 and 1000 mg/Kg) reduced the abdominal writhing (51.5 and 54.5%, respectively), the indomethacin group also had decreased number of contractions (59.2%) compared to control group (mean = 35.17) treated only with CBX 0.5%. In the hot plate test no experimental group showed statistical difference compared with control CBX. Therefore, our data suggest that the EAED has potential nociceptive action by decreasing acute pain caused by chemical agents, and this action may be related to the secondary metabolites present in the EAED.

Key words: antinociceptive; Myrtaceae; *Eugenia dysenterica*; abdominal writhing; hot plate; folk medicine

Lista de Figuras

Figura 1: Estrutura química dos principais metabólitos secundários.	12
Figura 2: <i>Eugenia dysenterica</i> / Cagaiteira	19
Figura 3: Efeito antinociceptivo do extrato aquoso da <i>Eugenia dysenterica</i> (EAED) em modelo experimental de contorções abdominais.	23

Lista de abreviaturas e siglas

AA	Ácido aracdônico
AINES	Anti-inflamatório não esteroideal
ANOVA	<i>Analyze of variance</i>
CBX	Carboximetilcelulose
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX	Ciclooxigenase
EAED	Extrato aquoso das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i>
I_{AN}	Índice antinoceptivo
IL	Interleucina
INDO	Indometacina
I.P.	Via intraperitoneal
MAPK	Proteína quinase ativada por mitógenos
NF-κB	Fator nuclear κB
NOSi	Óxido nítrico sintase induzível
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF_{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PGH₂	Prostaglandina H ₂
PGI	Prostaciclina
PPAR	Receptor acoplado ao proliferador do peroxissomo
REBIR	Rede de biotérios de roedores
SNC	Sistema nervoso central
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
TRPV1	Receptor vaniloide de potencial transitório do tipo 1
V.O.	Via oral
UFU	Universidade Federal de Uberlândia

Lista de símbolos

5-HT	Serotonina
Cr^{IV}	Cromo IV
kDa	Kilodaltons
NaCl	Cloreto de sódio

Sumário

1 Introdução.....	11
1.1 Família <i>Myrtaceae</i> e <i>Eugenia dysenterica</i>	11
1.2 Atividades biológicas do gênero <i>Eugenia</i>	11
1.3 Compostos bioativos no gênero <i>Eugenia</i>	12
1.4 Dor e nocicepção	14
2 Justificativa.....	16
3 Objetivos.....	17
3.1 Geral.....	17
3.2 Específicos	17
4 Metodologia.....	17
4.1 Local de Execução	17
4.2 Material vegetal	18
4.3 Animais	19
4.4 Grupos experimentais	20
4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva	20
4.5.1 Teste de contorções abdominais.....	20
4.5.2 Teste da placa quente	21
4.6 Protocolo de eutanásia	21
4.7 Análise Estatística.....	21
5 Resultados.....	22
5.1 Teste de contorções abdominais	22
5.2 Teste da placa quente	22
6 Discussão	24
7 Conclusões.....	28
Referências	29

1 Introdução

1.1 Família *Myrtaceae* e *Eugenia dysenterica*

A família de plantas *Myrtaceae* é uma das mais importantes do cerrado brasileiro, possuindo um número expressivo de gêneros e espécies, 140 e 4.620 respectivamente (DEXHEIMER; POZZOBON, 2017; PAULA et al., 2008).

O gênero *Eugenia* da família *Myrtaceae* inclui espécies frutíferas, dentre elas, a cereja-brasileira (*Eugenia brasiliensis*), a uvaia (*Eugenia pyriformis*), a pitanga (*Eugenia uniflora*), o araçá-boi (*Eugenia stipitata*), e a cagaita (*Eugenia dysenterica*)(DE ARAÚJO et al., 2019; DE SOUZA et al., 2018).

A espécie *Eugenia dysenterica*, nativa do cerrado brasileiro, é uma árvore de porte mediano, com tronco podendo chegar a aproximadamente 10 metros de altura, possui galhos e ramos tortuosos, seus principais usos estão relacionados à ornamentação e por ser melífera. Seu tronco e casca pode ser utilizado para produção de carvão e cortiça. Possui um fruto amarelo-claro, formato globoso e levemente achatado, sua maior utilização está no ramo alimentício, com a utilização dos seus frutos para produção de geleias. A formação de seus frutos e sua troca de folhas ocorrem próximas ao mês de setembro (CAMILO et al., 2013; SANTOS et al., 2012; TELLES et al., 2001).

1.2 Atividades biológicas do gênero *Eugenia*

De acordo com a literatura, derivados vegetais de espécies do gênero *Eugenia* têm demonstrado propriedades biológicas, dentre elas potencial farmacológico, confirmando, do ponto de vista científico, os benefícios do seu uso popular. Na medicina popular, os frutos, folhas e cascas de espécies do gênero *Eugenia* são utilizados na preparação de chás, decocção e infusão, utilizados no tratamento de doenças infecciosas, cardíacas e desordens gastrointestinais, bem como agentes hipotensores, hipoglicemiantes, antipiréticos e redutores dos níveis de triglicerídeos e colesterol. Além disto, alguns derivados vegetais são usados como repelentes e inseticidas (CECÍLIO et al., 2012; DE SOUZA et al., 2018; RAJ; GEORGE; SETHURAMAN, 2011)

Estudos demonstraram efeitos analgésicos utilizando o extrato bruto das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora*) (FALCÃO et al., 2018); o óleo essencial do cravo (*Eugenia caryophyllata*) (KHALILZADEH; HAZRATI; SAIHAH, 2016); o extrato das folhas do jambo

(*Eugenia jambos*) (ÁVILA-PENÑA et al., 2007); e um extrato hidroetanólico das folhas da murta vermelha (*Eugenia punicifolia*) (BASTING et al., 2014).

Alguns derivados da espécie vegetal *Eugenia dysenterica* apresentaram efeitos farmacológicos como: o óleo essencial que apresentou atividade antidiarreica (GALHEIGO et al., 2016) e efeito cicatrizante em modelo experimental *in vitro* e *in vivo* (DA SILVA et al., 2019); o extrato aquoso da referida espécie foi identificada atividade anticolinesterásica (GASCA et al., 2017), atividade gastroprotetora (PRADO et al., 2014); o extrato hidroetanólico apresentou as atividades antioxidantes e neuroprotetora em um estudo (THOMAZ et al., 2018) e em outro apresentou uma atividade de diminuição da toxicidade celular induzida por Cr^{IV} (ÁVILA et al., 2016). De modo geral, as atividades biológicas descritas em estudos que utilizaram derivados vegetais de espécies do gênero *Eugenia* são atribuídas à presença de metabólitos secundários (BAILÃO et al., 2015; DEWICK, 2009).

1.3 Compostos bioativos no gênero *Eugenia*

Análises fitoquímicas de derivados de espécies vegetais do gênero *Eugenia*, incluindo a espécie *Eugenia dysenterica*, apontaram a presença de metabólitos secundários, como flavonoides, taninos e terpenoides (**Figura 1**) (SOBEH et al., 2019; SOBRAL - SOUZA et al., 2019; VITEK et al., 2017).

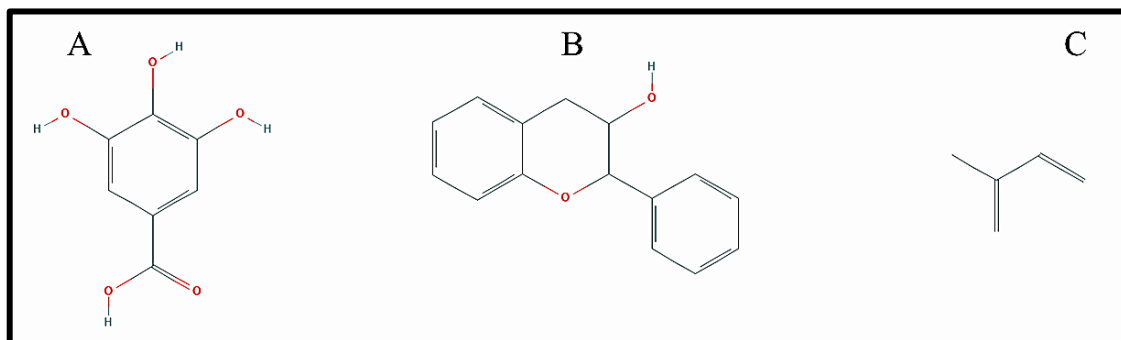


Figura 1: Estrutura química dos principais metabólitos secundários. (A) Molécula do ácido gálico, do grupo dos taninos (B) Flavan-3-ol, molécula precursora dos flavonoides, pode-se observar os anéis aromáticos. (C) Molécula de isopreno precursora dos terpenoides. Fonte: pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/

Metabólitos secundários são substâncias produzidas pelas plantas que servem para sua proteção, já que podem ter atividade de inibição em insetos, e atração de polinizadores. Contudo esses compostos não são de extrema importância para a manutenção metabólica do espécime. A concentração e características químicas dos metabólitos secundários podem

variar de acordo com a espécie vegetal, sazonalidade, e a fase de desenvolvimento, porém nunca são abundantemente encontradas nas espécies (BOURGAUD et al., 2001; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SHARMA; GARG, 2015).

Flavonóides são compostos polifenólicos e protegem as plantas de estresses bióticos ou abióticos, como a luz ultravioleta, esses compostos também são responsáveis pelas cores das plantas (SAMANTA; DAS; DAS, 2011).

Terpenos são considerados a maior classe de produtos naturais, já que mais de 55.000 foram descritos, e são derivados de uma molécula de isopreno. Mais de 87 terpenos possuem atividades analgésicas (GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014).

Taninos são compostos fenólicos de alto peso molecular, variando de 500 a mais de 3.000 kDa, e são encontrados nos vacúolos da maioria dos tecidos das plantas. Esses compostos costumam se associar a proteínas, amido, celulose e minerais. Atualmente, o termo tanino ainda não está precisamente definido, já que eles são classificados de acordo com sua capacidade de se ligar a proteínas (HASSANPOUR et al., 2011).

Metabólitos secundários podem apresentar atividade farmacológica analgésica e anti-inflamatória, como, por exemplo, alguns presentes na espécie *Leonurus cardiaca*, que aumentaram o tempo de latência no teste da placa quente quando extraídos através de uma preparação hidro-etanólica, uma fração desse extrato com alguns diterpenos também diminuiu o número de contorções abdominais quando comparados com a aspirina e o paracetamol (WOJTYNIAK; SZYMAŃSKI; MATŁAWSKA, 2013).

Alguns flavonoides possuem efeitos anti-inflamatórios por inibirem enzimas responsáveis pela transdução de sinais nas células inflamatórias, fazendo assim com que não haja a ativação da resposta imune. Além disso, esses compostos podem inibir a expressão das enzimas óxido nítrico sintase induzível, ciclooxigenase e lipooxigenase responsáveis, respectivamente, pela produção de óxido nítrico, prostanoídes e leucotrienos. Um importante efeito anti-inflamatório dos flavonóides está na diminuição da biossíntese de citocinas que medeiam a adesão e migração de células de defesa circulantes ao local do dano tecidual (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; KUMAR et al., 2013; PINHO-RIBEIRO et al., 2015).

A miricitrina é um flavonoide derivado glicosilado da miricetina. Esse flavonoide glicosilado é capaz de inibir a atividade e a expressão da NOSi, além disso inibe a migração do NF- κ B do citoplasma para o núcleo e inibe a MAPK p38 α , uma quinase responsável pela produção de citocinas pró-inflamatórias, tendo assim atividade anti-inflamatória e analgésica (MEOTTI et al., 2007; ZARUBIN; HAN, 2005).

O ácido gálico é um composto do grupo dos taninos hidrolisáveis e parece estar ligado às atividades anti-inflamatória e analgésica de algumas das espécies por inibir a COX, principalmente a isoforma 2 (COX-2), e impedir a migração do NF- κ B, diminuindo, assim, a síntese de proteínas relacionadas à inflamação (LIMA et al., 2016).

O cavacrol e o timol, são isômeros terpenoides, parecem inibir a síntese de citocinas, tais como TNF- α , IL-6 e IL-1 β por uma via colinérgica, já que a acetilcolina está envolvida na liberação desses mediadores. Além disso, outros estudos com monoterpenos indicam a inibição da COX-2 e ativação dos PPARs α e γ , alterando a síntese de proteínas e levando a uma atividade anti-inflamatória. Um terpenoide chamado γ -Terpineno apresentou atividade analgésica por meio da via inibitória descendente, que será descrita adiante, mais especificamente por atividade direta nos receptores opioides (DE SIMONE et al., 2005; GUIMARÃES; SERAFINI; QUINTANS-JÚNIOR, 2014; LIANG; LU, 2012; PASSOS et al., 2015).

1.4 Dor e nocicepção

A nocicepção ocorre quando há a ativação de receptores especializados no reconhecimento de estímulos nocivos, sejam eles químicos, mecânicos ou térmicos, chamados de nociceptores. Sinais aferentes reconhecidos por nociceptores são conduzidos ao sistema nervoso central (SNC) por fibras sensoriais primárias denominadas fibras A δ (A-delta), e fibras C. A sensação mais comum conduzida por essas vias é a dor (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014).

As fibras tipo A δ são de grande calibre e mielinizadas, enquanto as fibras tipo C possuem menor diâmetro e não são mielinizadas. De acordo com a velocidade de condução, as fibras A δ tem um comprimento mediando, variando entre um e seis metros, e são capazes de uma rápida transmissão de informações, de 6 a 30 m/s; as fibras C possuem menos de um metro e meio de comprimento e por serem desmielinizadas possuem uma velocidade de transmissão menor, variando entre 0,5 e 2 m/s (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014). A dor rápida, aguda e localizada, é conduzida ao SNC por fibras do tipo A δ , enquanto a dor lenta, mais difusa, é conduzida por fibras C (BASBAUM et al., 2009).

A ativação dos nociceptores pode resultar, por sua vez, na ativação de vias de respostas protetoras reflexas, integradas na medula espinhal, e de vias ascendentes para o córtex cerebral as quais tornam a sensação de dor consciente. Estímulos irritantes que levam a

respostas integradas na medula espinhal iniciam reflexos protetores inconscientes. Isto ocorre, por exemplo, quando um animal toca uma placa quente; o animal reage no sentido de afastar-se do estímulo térmico, antes de ter percepção da dor (DAS, 2015; MOHAMMADI et al., 2013).

A dor é um aviso ao organismo de que algo está errado e, assim como a sede e a fome, esse aviso cria um estado de aversão ao estímulo que o causa. A dor, portanto, seria a junção do estímulo nociceptivo às suas implicações emocionais e cognitivas (PORRECA; NAVRATILOVA, 2017).

A dor nociceptiva é associada a terminações nervosas livres, cujos canais iônicos são sensíveis a estímulos químicos, mecânicos e térmicos. Em local de dano tecidual, mediadores inflamatórios liberados por diferentes tipos de células e plaquetas, dentre eles, prostaglandinas, histamina, serotonina e substância P modulam a ativação dos nociceptores, ativando-os ou sensibilizando-os, de modo a diminuir o seu limiar de ativação. A sensibilidade à dor aumentada no local de lesão tecidual é denominada dor inflamatória (DAS, 2015). Tecidos lesionados liberam moléculas que podem causar estado de hiperalgesia, ou seja, aumento da sensibilidade à dor (JESKE, 2015).

Os prostanoídes são mediadores inflamatórios derivados do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo com vinte átomos de carbono, o qual é biotransformado pela via das ciclooxigenases (COX) ou lipooxigenases (LOX). Na via das COX, o AA leva a metabólitos intermediários instáveis e, em seguida, convertidos em prostaglandinas ou tromboxanos. Estudos demonstraram que a presença da COX nos sítios de inflamação causa aumento da sensibilidade mecânica e térmica (VARDEH et al., 2009). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal prostanóide envolvido na nocicepção, ao modular o fluxo de íons em nociceptores e em fibras aferentes por meio da interação com seus receptores, os quais ativam proteínas quinases que fosforilam e diminuem o limiar de ativação de canais iônicos (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; KAWABATA, 2011).

A dor é modulada por uma via descendente, ou seja, o estímulo modulador sai do encefalo para a medula e alguns dos neurotransmissores envolvidos são a norepinefrina, a serotonina e moléculas opióides endógenas (BANNISTER; DICKENSON, 2017).

A norepinefrina, age em receptores α_2 adrenérgicos na medula, os quais são acoplados a proteínas Gi/o, causando uma diminuição da condução ao cortex de potenciais de ação que chegam a medula. Os receptores para moléculas opióides também são acoplados a proteína Gi/o, tendo seu mecanismo de ação semelhante ao da norepinefrina, ou seja, por meio da

hiperpolarização da célula que está conduzindo os estímulos da medula ao cortex. No entanto, a serotonina parece ter dupla função na passagem desses estímulos nociceptivos. Na periferia sua ação é majoritariamente facilitação, diferente do que ocorre na parte central onde há uma maior inibição ligada a liberação de 5HT. Essas ações são relacionadas à ativação de receptores, como o 5-HT₂, que são acoplados a proteínas Gq, 5-HT₃ que é acoplado a um canal iônico que facilita a passagem do íon sódio (Na⁺) e 5-HT₁, acoplado a proteína Gi/o (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; BANNISTER; DICKENSON, 2017; CORTES-ALTAMIRANO et al., 2018; HOYER et al., 1994; STROSBURG, 1993).

A dor é um problema de saúde pública e causa uma série de dificuldades como: imunossupressão, distúrbios alimentares e insônia (MITSI; ZACHARIOU, 2016). Os tratamentos mais comumente utilizados no tratamento da dor são: analgésicos, como o paracetamol, os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), os medicamentos opiáceos e associação de anticonvulsivantes ou antidepressivos com as drogas citadas anteriormente (HORGAS, 2017). Alguns dos fármacos citados utilizam da via descendente inibitória da dor para obter o seu efeito, como, por exemplo, os fármacos antidepressivos e anticonvulsivantes que parecem estar relacionados ao aumento da liberação de opioides endógenos e ao aumento da quantidade de norepinefrina na via moduladora, fazendo, assim, com que haja uma menor condução de estímulos da periferia (KREMER et al., 2016). O paracetamol está envolvido com a via descendente inibitória da dor, já que este fármaco interage com as transmissões serotoninérgica, opioidérgica, adrenérgica, dentre outras (VIJAYAKARAN et al., 2014). Os AINEs agem inibindo a produção de prostaglandinas, e por isso, diminuem a hiperalgesia causada por estas moléculas. Os opiáceos são moléculas derivadas da espécie *Papaver somniferum* que são agonistas de receptores opioides (TRECOT et al., 2008).

2 Justificativa

Os atuais medicamentos utilizados para tratamento da dor, possuem numerosos efeitos adversos ao organismo como: constipação, problemas cardiovasculares e dependência, no caso de medicamentos opioides (KHADEMI et al., 2016); os AINEs causam distúrbios no trato gastrointestinal, nos sistemas renal e cardiovascular (RAHMAN; MALCOUN, 2014; SCHJERNING OLSEN; FOSBØL; GISLASON, 2014; YANG et al., 2015). Assim, a pesquisa de novas drogas com potencial efeito anti-inflamatório e menos efeitos adversos é bastante relevante.

A família *Myrtaceae* apresenta espécies, como a *Psidium guajava* (DE ARAÚJO et al., 2014), a *Eugenia uniflora* (FALCÃO et al., 2018.) e a *Campomanesia xanthocarpa* (DA SILVA et al., 2016) com ações anti-inflamatórias, as quais foram atribuídas à presença de metabólitos secundários específicos, dentre eles, os flavonoides.

Contudo, apesar de análises fitoquímicas demonstrarem a presença de compostos bioativos com potencial ação anti-inflamatória em derivados vegetais da espécie *Eugenia dysenterica*, poucos estudos investigaram o seu potencial anti-inflamatório ou analgésico. Neste sentido, considerando-se 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 (LINGARAJU et al., 2014) não é incomum encontrarmos drogas que possuam ambas as atividades farmacológicas, analgesia e anti-inflamatória. Esses fatores associados aos efeitos adversos de medicamentos anti-inflamatórios citados anteriormente fomentaram a presente proposta de investigarmos os possíveis efeitos analgésicos do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* utilizando um modelo experimental *in vivo*.

3 Objetivos

3.1 Geral

A presente proposta experimental teve como objetivo geral investigar o efeito antinociceptivo do extrato aquoso liofilizado das folhas da espécie *Eugenia dysenterica* em modelo experimental *in vivo*.

3.2 Específicos

- Preparar o extrato aquoso da *Eugenia dysenterica*.
- Avaliar a atividade antinociceptiva por meio da realização dos seguintes testes:
 - Teste de contorções abdominais;
 - Teste da placa quente.

4 Metodologia

4.1 Local de Execução

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM)

/Universidade Federal de Uberlândia (UFU) e nos Laboratórios de Experimentação Animal do Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores da UFU (REBIR-UFU).

4.2 Material vegetal

O extrato aquoso da *E. dysenterica* (EAED) foi preparado no laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais. A espécie *E. dysenterica*, a partir da qual foram coletadas as folhas para a preparação do extrato aquoso, foi previamente identificada por biólogo competente e uma exsicata da espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro: HUFU-45956).

Para este estudo, o extrato aquoso foi obtido a partir das folhas da *E. dysenterica* (**Figura 2**) coletadas em campos de vegetação espontânea em novembro/2018, na Fazenda Pasto Velho em Lassance, MG e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava. Após a colheita, as folhas foram separadas dos galhos, destacaram-se os pecíolos, e foram selecionadas apenas aquelas que, macroscopicamente, não apresentavam indicativos de contaminação por microrganismos. Posteriormente, as folhas foram lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 20% (m/v) por 48 horas a temperatura ambiente. O extrato foi duplamente filtrado 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 a – 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 (PRADO et al., 2014).



Figura 2: *Eugenia dysenterica*/ Cagaiteira (Fonte: Canabrava, H. A. N., 2017). Origem: Fazenda Pasto Velho, Lassance, MG. Árvore com, aproximadamente, 2,5 m de altura e com frutos imaturos no momento da coleta da exsicata.

4.3 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 25 a 37g. Os animais foram fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia e foram mantidos no Biotério Central da REBIR, sob condições padrões de 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 Universidade Federal de Uberlândia (PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 061/18).

A administração por via oral de fármacos, veículos ou extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* 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.

4.4 Grupos experimentais

A avaliação da atividade antinociceptiva do EAED foi realizada por meio dos testes de contorções abdominais e da placa quente. Em ambos os testes, foram utilizados camundongos BALB/c divididos em cinco grupos, e tratados por via oral (v.o.) com o EAED nas doses 100, 550 e 1000 mg/Kg (PRADO et al, 2014), solubilizado em carboximetilcelulose (CBX) 0,5% (m/v), ou com indometacina (INDO), um anti-inflamatório não esteroideal (AINE), solubilizada em CBX 0,5%, ou tratados somente com CBX 0,5% (veículo usado na solubilização do EAED e da INDO). Assim, de acordo com o tratamento recebido, os grupos experimentais foram:

0 (n = 6 ou 7): tratamento com solução de CBX 0,5%, (v.o.);

INDO (n = 7): tratamento com indometacina (10 mg/Kg; v.o.);

EAED 100 (n = 7): tratamento com EAED (100 mg/Kg; v.o.);

EAED 550 (n = 7): tratamento com EAED (550 mg/Kg; v.o.);

EAED 1000 (n = 6 ou 7): tratamento com EAED (1000 mg/Kg; v.o.).

4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.5.1 Teste de contorções abdominais

O teste de contorções abdominais (dor visceral) foi descrito originalmente por Koster et al., em 1959. As contorções abdominais envolvem uma contorção da musculatura abdominal, imediatamente seguida pelo estiramento dos membros inferiores. Geralmente, este modelo é empregado para o *screening* inicial de novas moléculas com potencial analgésico (CARLINI; MENDES, 2011).

Após sessenta minutos os tratamentos por via oral os animais, dos grupos experimentais descritos no item 4.4, receberam injeção por via intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,9% (v/v) em solução salina (NaCl 0,9%) estéril (1 mL de solução de ácido acético/100 g de peso corporal), como agente indutor das contorções abdominais (BATISTA et al., 2016; PINHEIRO et al., 2011; WHITTLE, 1964). O número de contorções abdominais foi registrado por dois observadores, entre 10 e 30 minutos, após a administração do ácido acético. A atividade antinociceptiva do extrato da *E. dysenterica* foi avaliada por determinação do número das contorções exibidas pelos animais tratados com os EAEDs em relação ao número de contorções dos animais dos grupos controles. Os grupos 0 e INDO foram utilizados como controles negativo e positivo para o efeito antinociceptivo,

respectivamente. Os índices percentuais de efeito antinociceptivo (I_{AN}) do EAED, nas diferentes doses, foi calculado da seguinte maneira:

$$I_{AN} (\%) = 100 - \left(\frac{N^{\circ} \text{ médio de contorções do grupo} \times 100}{N^{\circ} \text{ médio contorções CBX}} \right)$$

4.5.2 Teste da placa quente

Este método de avaliação do limiar de sensibilidade térmica foi descrito por Hargreaves et al. (1988). A intensidade do estímulo térmico deve ser adequada para cada tipo de avaliação, com base na resposta basal dos animais. A avaliação foi feita em duplicata (os animais foram avaliados por duas vezes consecutivas), com intervalo de 20 segundos entre os dois registros, e a média das duas avaliações representa o tempo de latência para o animal exibir reações de dor ao estímulo térmico (CARLINI; MENDES, 2011).

Após os tratamentos por via oral (tempos: zero, 30, 60 e 90 minutos), os animais dos grupos experimentais (0, EAED 100, 550 ou 1000 mg/Kg) foram colocados individualmente sobre uma placa de alumínio aquecida ($55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) (EDDY; LEIMBACH, 1953; FALCÃO et al., 2018). Em seguida, foi registrado o tempo, em segundos, para o animal exibir as primeiras reações de nocicepção (saltos, lambadura, retirada ou sacudida das patas dos membros posteriores ou anteriores). Após as primeiras manifestações de dor, o animal era retirado da placa quente. O tempo de 30 segundos foi utilizado como limite de permanência do animal no aparato para evitar lesão tecidual.

4.6 Protocolo de eutanásia

Os animais foram previamente anestesiados com xilazina-cetamina (10 e 100 mg/kg, i.p., respectivamente) e eutanasiados por deslocamento cervical (CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL, 2018).

4.7 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 foram expressos como a média $\pm$ E.P.M (erro padrão da média). A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni, após a verificação pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov que as variáveis exibiam distribuição normal. Todos os resultados foram considerados significantes para um nível de $p < 0,05$.

5 Resultados

5.1 Teste de contorções abdominais

No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, os resultados obtidos mostram que o EAED apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente, como pode ser observado pela diminuição do número de contorções abdominais nos grupos tratados com o extrato nas concentrações 550 (média = $17,07 \pm 3,82$) e 1.000 (média = $16,00 \pm 1,68$) mg/Kg, comparados ao grupo controle CBX (média = $35,17 \pm 5,49$). Os índices percentuais de efeito antinociceptivo (I_{AN}) dos EAED 550 e EAED 1.000 foram, respectivamente, 51,5% e 54,5%. De modo semelhante, o AINE indometacina, na dose 10 mg/Kg, também se mostrou eficaz como antinociceptivo (média = $14,36 \pm 1,76$), reduzindo em, aproximadamente, 59,2% (I_{AN}), o número de contorções abdominais, comparado ao grupo CBX. Contudo, não houve diferença estatística significativa entre os grupos tratados com o EAED (550 e 1.000 mg/Kg) e aquele tratado com INDO (**Figura 3**).

5.2 Teste da placa quente

O tratamento dos animais com o EAED, em todas as concentrações utilizadas (EAED 100, 550 e 1.000 mg/Kg), não produziu efeito antinociceptivo, avaliado por meio do teste da placa quente, nos diferentes tempos (0, 30, 60 90 min) comparado ao grupo controle tratado apenas com CBX (grupo 0). Os dados obtidos estão expressos como média $\pm$ E.P.M (**Tabela 1**).

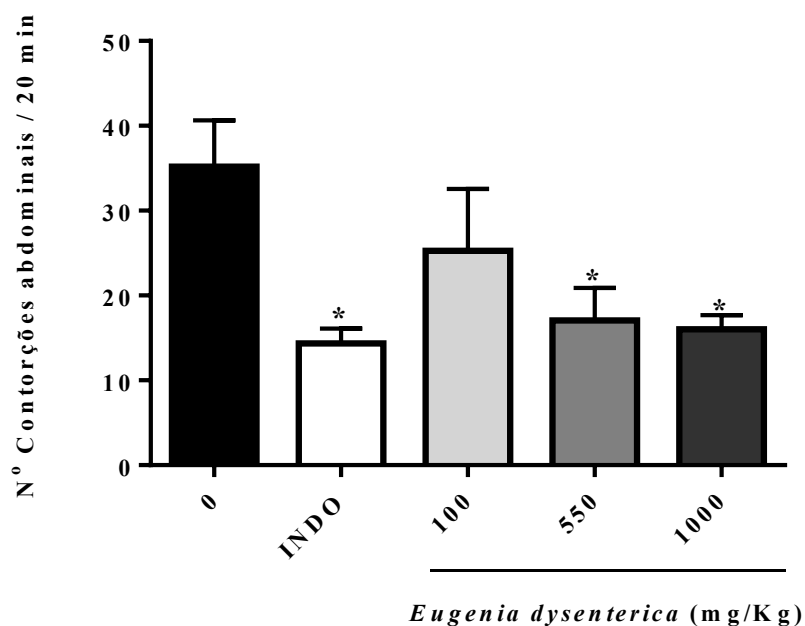


Figura 3: Efeito antinociceptivo do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* (EAED) em modelo experimental de contorções abdominais. Camundongos BALB/c foram divididos em cinco grupos (n = 6 ou 7/grupo) tratados por via oral com indometacina (INDO), ou como extrato nas doses 100, 550 e 1.000 mg/Kg, ou somente com o veículo carboximetilcelulose (grupo 0). Após sessenta minutos os tratamentos por via oral, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético para indução das contorções abdominais. O número de contorções abdominais foi registrado entre 10 e 30 minutos, após a injeção i.p. de ácido acético (T = 20 min). A atividade antinociceptiva do EAED foi avaliada por determinação do número das contorções exibidas pelos animais tratados com o extrato em relação ao número de contorções dos animais dos grupos controles (0 e INDO). *Significância estatística entre os grupos tratados (INDO e *E. dysenterica* 550 e 1.000 mg/Kg) e o controle (grupo 0), (ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, $p < 0,05$).

	0 min	30 min	60 min	90 min
Grupo	Tempo de latência (segundos)			
0	5.456 ± 0.2923	5.436 ± 0.5038	5.601 ± 0.4276	5.422 ± 0.5028
EAED (100 mg/Kg)	5.047 ± 0.3771	5.307 ± 0.4443	5.245 ± 0.4122	5.609 ± 0.6204
EAED (550 mg/Kg)	4.988 ± 0.4423	4.794 ± 0.3422	5.085 ± 0.3950	5.387 ± 0.5051
EAED (1000 mg/Kg)	5.723 ± 0.4195	5.777 ± 0.5203	4.998 ± 0.3398	5.428 ± 0.4539

Tabela 1. Efeito do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* (EAED) sobre o limiar de sensibilidade térmica de camundongos BALB/c submetidos ao teste da placa quente. Os animais foram divididos em cinco grupos experimentais (n = 7/grupo) tratados por via oral com EAED nas doses 100, 550 e 1.000 mg/Kg, ou somente com o veículo carboximetilcelulose (grupo 0). Em seguida, os animais foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida ($55 \pm 0,5$ °C) imediatamente após os tratamentos (tempo 0 min) ou após 30, 60 e 90 min. Os tempos de latência para o animal exibir as primeiras reações de nocicepção foram registrados e correspondem ao limiar de sensibilidade térmica. Não houve significância estatística nas comparações entre os grupos tratados (*E. dysenterica* 100, 550 e 1.000 mg/Kg) e o controle (grupo 0) nos tempos 0, 30, 60 e 90 min (ANOVA seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, $p > 0,05$).

6 Discussão

Espécies vegetais do Cerrado brasileiro, dentre elas, *Eugenia dysenterica*, são fontes ricas de compostos bioativos com potencial farmacológico (BAILÃO et al., 2015). Derivados vegetais, como óleos essenciais, obtidos a partir das folhas da *E. dysenterica* são utilizados na medicina tradicional como anti-inflamatórios, antimicrobianos, anti-hipertensivos, antidiarreicos e purgativos e, do ponto de vista científico, estas ações têm sido atribuídas aos metabólitos secundários encontrados na referida espécie. Análises fitoquímicas identificaram a presença de terpenos, compostos alifáticos, flavonoides e taninos em espécies do gênero *Eugenia* (DE SOUZA et al., 2018) e estudos têm demonstrado propriedades anti-inflamatórias e analgésicas relacionadas a essas substâncias (SOBEH et al., 2019). Assim, neste sentido, o presente estudo investigou possível ação antinociceptiva do extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica*.

O teste de contorções abdominais foi descrito originalmente por Koster et al., em 1959. As contorções abdominais envolvem uma contorção da musculatura abdominal, imediatamente seguida pelo estiramento dos membros posteriores, como resposta reflexa à peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de uma substância irritante, como uma solução

de ácido acético 0,9%. Geralmente, este modelo é empregado para o *screening* inicial de novas moléculas com potencial analgésico, já que a administração de ácido acético causa a liberação de substâncias pró-inflamatórias, como as prostaglandinas (por exemplo, PGE₂ e PGF_{2α}), bradicininas, substância P e citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1, IL-6, IL-8 e TNF-α. O peritônio parietal é innervado por fibras somáticas e viscerais e a injeção de ácido acético causa um efeito nocivo que leva a uma contração reflexa. (CARLINI; MENDES, 2011; DE LA PUENTE et al., 2017; NAGHIZADEH; MANSOURI; GHORBANZADEH, 2016)

Testes que utilizam estímulos térmicos para avaliar efeito antinociceptivo incluem o teste da placa quente. O teste da placa quente é utilizado como modelo experimental para estudo de substâncias que tenham mecanismos de ação associados à antinocicepção central (DOS SANTOS et al., 2014; LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). No teste da placa quente utiliza-se uma placa metálica aquecida entre 52 e 56 °C, sobre a qual os animais são colocados individualmente e registra-se o tempo que o animal permanece sobre esse aparato até a primeira reação ao estímulo térmico. Este intervalo de tempo é referido como tempo de latência (SILVA et al., 2013). O estímulo térmico ativa receptores vaniloides, como o TRPV1, em nociceptores estimulando-os. Estes, por sua vez, conduzem a informação ao SNC produzindo uma resposta nociceptiva (BATISTA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

Em nosso estudo, o extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica*, administrado por via oral, apresentou efeito antinociceptivo dose-dependente no teste de contorções abdominais, com inibição no número de contorções abdominais de 51,5% e 54,5%, em comparação ao grupo controle tratado apenas com o veículo carboximetilcelulose, nas doses de 550 e 1.000 mg/Kg, respectivamente. De modo semelhante, o anti-inflamatório não esteroide indometacina, utilizado como controle positivo de efeito antinociceptivo, também foi eficaz na redução das contorções abdominais em 59,2%. Contudo, o efeito antinociceptivo do extrato não foi significativamente diferente daquele observado com o fármaco indometacina.

Esses achados sugerem, portanto, que EAED possui ação antinociceptiva em modelo experimental de dor aguda, induzida por um agente químico, como o ácido acético. Uma vez que o ácido acético induz efeito de algesia por evocar uma reação inflamatória aguda relacionada à produção de mediadores inflamatórios, incluindo, prostaglandinas, leucotrienos, histamina, serotonina, bradicinina e citocinas, os quais reduzem o limiar de ativação de fibras nociceptivas (BAHAMONDE et al., 2013), podemos inferir que o efeito antinociceptivo do EAED pode estar relacionado à diminuição na produção de mediadores algésicos por células

inflamatórias peritoneais, tais como macrófagos e basófilos, mecanismo este associado ao efeito antinociceptivo da indometacina. A indometacina é um inibidor competitivo reversível das ciclooxigenases 1 (COX-1) e 2 (COX-2), as quais atuam na via de metabolização do ácido araquidônico levando à biossíntese de prostanoide, prostaglandinas e tromboxanos. A inibição enzimática reduz os níveis de prostaglandinas produzidas, incluindo PGE₂ e PGI₂ com ações de hiperalgesia (AHLUWALIA et al., 2019; JESKE, 2015; KAWABATA, 2011).

Em seguida, para avaliar se o EAED possuía atividade antinociceptiva central, foi realizado o teste da placa quente com animais tratados por via oral com diferentes concentrações do EAED, como foi feito no teste das contorções abdominais. Neste modelo experimental, não foi evidenciado efeito antinociceptivo comparando-se os grupos de animais tratados com o extrato e o grupo controle tratado apenas com o veículo, em todos os tempos analisados. Uma vez que o teste da placa quente é também um instrumento válido para detectar compostos bioativos com propriedades semelhantes àquelas de substâncias opioides, os dados obtidos sugerem que o EAED não contém compostos bioativos ópio-símiles. Este resultado pode ser explicado pelo fato de que, no teste da placa quente, apenas os analgésicos centrais aumentam o tempo de resposta ao estímulo térmico (BATISTA et al., 2016; SILVA et al., 2013).

Outras espécies do gênero *Eugenia* também demonstraram efeito antinociceptivo. Extrato bruto das folhas da *Eugenia uniflora*, extraído a partir de uma mistura de água e acetona e duas frações derivadas deste extrato, fração acetato de etila e fração aquosa, apresentaram efeito antinociceptivo em modelo experimental de contorções abdominais. No teste da placa quente, a fração aquosa aumentou o tempo de latência para reações de dor ao estímulo térmico. Neste estudo, foram detectados os metabólitos secundários miricitrina e ácidos elágico e gálico, no extrato e nas frações, aos quais são atribuídas ações anti-inflamatórias (FALCÃO et al., 2018). Os mecanismos de ação dos metabólitos citados estão elucidados na literatura. O ácido gálico é um tanino hidrolisável e age inibindo a COX, principalmente a isoforma 2; além disto, o ácido gálico e o elágico inibem a migração do fator de transcrição NF-κB ao núcleo em células-alvo, diminuindo, assim, a síntese proteica de mediadores pró-inflamatórios (LIMA et al., 2016; ROGERIO et al., 2008; SEPÚLVEDA et al., 2011).

Outro estudo, também utilizou os testes de contorções abdominais e da placa quente para avaliar a atividade analgésica do óleo essencial de cravo (*Eugenia caryophyllata*). Os resultados mostraram uma diminuição de 87,7% no número de contorções no grupo tratado

com o óleo essencial, comparado ao grupo controle. No teste da placa quente o óleo essencial aumentou o tempo de latência em 82,3% quando comparado ao veículo (TAHER et al., 2015). Outra espécie da família Myrtaceae com atividade analgésica, avaliada pelo teste das contorções abdominais, é a *Pimenta pseudocaryophyllus*, conhecida popularmente como cataia. Análises fitoquímicas de um extrato etanólico, suas frações e do óleo essencial das folhas da referida espécie revelaram a presença de derivados da quercetina e os ácidos gálico e elágico (PAULA et al., 2012).

Neste sentido, análises fitoquímicas de extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* também identificaram metabólitos secundários, como a quercetina (GASCA et al., 2017). Esse metabólito, pertencente à classe dos flavonoides, inibe as duas isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2), reduzindo, assim, a síntese de PGH₂, precursor de prostaglandinas e tromboxanos; inibe a translocação do fator de transcrição NF-κB, inibindo a síntese de citocinas; inibe a COX-2 e a óxido nítrico sintase (NOSi). Portanto, possui propriedades anti-inflamatórias. Além disso, possui efeito analgésico relacionado à diminuição na síntese de prostanoide, bem como assim como atuando diretamente em vias dopaminérgicas e adrenérgicas, por meio de interações com receptores D2 e α₂, respectivamente (CHOI et al., 2012; GÜNAY et al., 2016).

Em estudo realizado por nosso grupo de pesquisa, foi feita a análise fitoquímica do extrato aquoso das folhas da *E. dysenterica*, espécie da qual foram coletadas as folhas para a preparação do EAED utilizado no presente trabalho. Essa análise identificou os metabólitos secundários catequina e procianidina (PRADO et al., 2014). A catequina pertence ao grupo dos polifenóis e possui efeitos anti-inflamatórios. Por meio, por exemplo, da inibição da migração do NF-κB ao núcleo, diminuído, assim, a resposta a estímulos inflamatórios (PAN et al., 2018). A atividade antinociceptiva da catequina já foi avaliada e este metabólito não aumentou o tempo de latência no teste da placa quente, porém no teste de contorções abdominais, diminuiu significativamente o número de contorções induzidas pelo ácido acético (ISLAM et al., 2019).

Considerando os dados da literatura apresentados e os resultados obtidos em nosso estudo, sugerimos que o EAED, a exemplo de outras espécies do gênero *Eugenia* e da família Myrtaceae, possui efeito antinociceptivo, o qual parece não estar envolvido com o sistema opioide. Este efeito poderia ser atribuído, pelo menos em parte, à presença de metabólitos secundários, tais como flavonoides e taninos, como a catequina, uma vez que não é incomum encontrarmos substâncias anti-inflamatórias com potencial analgésico. Contudo, outros

experimentos ainda deverão ser realizados para investigarmos uma potencial atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas da *Eugenia dysenterica*.

7 Conclusões

- O EAED possui ação antinociceptiva dose-dependente em modelo experimental de dor aguda, induzida por agente químico.
- EAED pode não conter compostos bioativos ópio-símiles.
- O AINE indometacina mostrou atividade antinociceptiva em modelo experimental de dor aguda induzida por agente químico.
- A atividade antinociceptiva do EAED pode ser atribuída, pelo menos em parte, aos metabólitos secundários encontrados nessa espécie, dentre eles, flavonoides e taninos.

Referências

- AHLUWALIA, A. et al. NSAID-induced injury of gastric epithelial cells is reversible. Roles of mitochondria, AMP kinase, NGF and PGE 2. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, 23 set. 2019.
- AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2011.
- ÁVILA-PEÑA, D. et al. Antinociceptive activity of Syzygium jambos leaves extract on rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 2, p. 380–385, jun. 2007.
- ÁVILA, R. I. DE et al. Eugenia dysenterica DC. (Myrtaceae) exerts chemopreventive effects against hexavalent chromium-induced damage in vitro and in vivo. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2652–2663, 1 nov. 2016.
- BAHAMONDE, S. M. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of Chiliotrichum diffusum. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 4, p. 699–705, jul. 2013.
- BAILÃO, E. F. L. C. et al. Bioactive compounds found in Brazilian cerrado fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, p. 23760–23783, 2015.
- BANNISTER, K.; DICKENSON, A. H. The plasticity of descending controls in pain: translational probing. **Journal of Physiology**, v. 595, n. 13, p. 4159–4166, 2017.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 16 out. 2009.
- BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of Eugenia punicifolia (Kunth) DC. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 257–267, 18 nov. 2014.
- BATISTA, E. K. . et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de Luehea divaricata. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, jun. 2016.
- BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: A historical perspective. **Plant Science**, v. 161, n. 5, p. 839–851, 2001.
- BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, 1 out. 2014.
- CAMILO, Y. M. V. et al. Fenologia, produção e precocidade de plantas de Eugenia dysenterica visando melhoramento genético. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 36, n. 2, p. 192–198, 2013.
- CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em Psicofarmacologia Comportamental** -. 1. ed. São Paulo: FAP-UNIFESP, 2011.

CECÍLIO, A. B. et al. Screening of Brazilian medicinal plants for antiviral activity against rotavirus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 975–981, 14 jun. 2012.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 58–66, jul. 2013.

CHOI, S.-J. et al. Antioxidative and anti-inflammatory effect of quercetin and its glycosides isolated from mampat (*Cratoxylum formosum*). **Food Science and Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 587–595, 30 abr. 2012.

CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução Normativa nº 37/2018**. Disponível em: <https://www.mctic.gov.br/mctic/export/sites/institucional/institucional/concea/arquivos/legislacao/resolucoes_normativas/Resolucao-Normativa-n-37-Diretriz-da-Pratica-de-Eutanasia_site-concea.pdf>. Acesso em: 25 jun. 2019.

CORTES-ALTAMIRANO, J. L. et al. Review: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ and 5-HT₇ Receptors and their Role in the Modulation of Pain Response in the Central Nervous System. **Current Neuropharmacology**, v. 16, n. 2, 2 jan. 2018.

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, 1 ago. 2016.

DA SILVA, S. M. M. et al. Wound healing effect of essential oil extracted from *eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaves. **Molecules**, v. 24, n. 1, p. 2, 2019.

DAS, V. An introduction to pain pathways and pain “targets”. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 131p. 1–30.

DE ARAÚJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone-water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 28 out. 2014.

DE ARAÚJO, F. F. et al. Wild Brazilian species of *Eugenia* genera (Myrtaceae) as an innovation hotspot for food and pharmacological purposes. **Food Research International**, v. 121, p. 57–72, 1 jul. 2019.

DE LA PUENTE, B. et al. Pharmacological sensitivity of reflexive and nonreflexive outcomes as a correlate of the sensory and affective responses to visceral pain in mice. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 13428, 18 dez. 2017.

DE SIMONE, R. et al. Activation of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor by nicotine selectively up-regulates cyclooxygenase-2 and prostaglandin E₂ in rat microglial cultures. **Journal of Neuroinflammation**, v. 2, 25 jan. 2005.

DE SOUZA, A. M. et al. Traditional Uses, Phytochemistry, and Antimicrobial Activities of *Eugenia* Species - A Review. **Planta Medica**, v. 84, n. 17, p. 1232–1248, 17 jul. 2018.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**. 3. ed. [s.l.] Wiley, 2009.

DEXHEIMER, G. M.; POZZOBON, A. Atividade biológica de plantas da família Myrtaceae: revisão sistemática de artigos entre 1989 e 2015. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 22, n. 2, 2017.

DOS SANTOS, G. C. ARMELIND. M. et al. Essential oil from *Myrcia ovata*: chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory properties in mice. **Planta medica**, v. 80, n. 17, p. 1588–1596, 1 nov. 2014.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385–93, mar. 1953.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* Linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 18, n. 1, p. 84, 2018.

GALHEIGO, M. R. U. et al. Antidiarrhoeic effect of *Eugenia dysenterica* DC (Myrtaceae) leaf essential oil. **Natural Product Research**, v. 30, n. 10, p. 1182–1185, 18 maio 2016.

GASCA, C. A. et al. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 996–1002, 2017.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, abr. 2007.

GUIMARÃES, A. G.; SERAFINI, M. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Terpenes and derivatives as a new perspective for pain treatment: A patent review. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 3, p. 243–265, mar. 2014.

GÜNAY, E. et al. Comparison of the Anti-inflammatory Effects of Proanthocyanidin, Quercetin, and Damnacanthol on Benzo(a)pyrene Exposed A549 Alveolar Cell Line. **Inflammation**, v. 39, n. 2, p. 744–751, 8 abr. 2016.

HASSANPOUR, S. et al. Plants and secondary metabolites (Tannins): A Review. **International Journal of Forest, Soil and Erosion**, v. 1, n. 11, p. 47–53, 2011.

HORGAS, A. L. Pain Management in Older Adults. **Nursing Clinics of North America**, v. 52, n. 4, p. e1–e7, 1 dez. 2017.

HOYER, D. et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacological Reviews**, v. 46, n. 2, p. 157–203, 1994.

ISLAM, S. et al. Antinociceptive activities of *Artocarpus lacucha* Buch-ham (Moraceae) and its isolated phenolic compound, catechin, in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 19, n. 1, dez. 2019.

JESKE, N. A. Peripheral scaffolding and signaling pathways in inflammatory pain. In: **Progress in Molecular Biology and Translational Science**. [s.l.] Academic Press, 2015. v. 131p. 31–52.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and Pain—An Update. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 8, p. 1170–1173, 2011.

KHADEMI, H. et al. Opioid Therapy and its Side Effects: A Review. **Archives of Iranian medicine**, v. 19, n. 12, p. 870–876, dez. 2016.

KHALILZADEH, E.; HAZRATI, R.; SAIAH, G. V. Effects of topical and systemic administration of *Eugenia caryophyllata* buds essential oil on corneal anesthesia and analgesia. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 4, p. 293, 2016.

KREMER, M. et al. **Antidepressants and gabapentinoids in neuropathic pain: Mechanistic insights** NeuroscienceElsevier Ltd, , 3 dez. 2016.

KUMAR, S. et al. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, p. 16, 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. **Animal models of nociception** Pharmacological Reviews, 2001.

LIANG, W. Z.; LU, C. H. Carvacrol-induced $[Ca^{2+}]_i$ rise and apoptosis in human glioblastoma cells. **Life Sciences**, v. 90, n. 17–18, p. 703–711, 15 maio 2012.

LIMA, K. G. et al. Gallic acid reduces cell growth by induction of apoptosis and reduction of IL-8 in HepG2 cells. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 84, p. 1282–1290, 2016.

LINGARAJU, M. C. et al. Analgesic activity of *Eugenia jambolana* leave constituent: A dikaempferol rhamnopyranoside from ethyl acetate soluble fraction. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 8, p. 1069–1078, 2014.

MEOTTI, F. C. et al. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 924–931, 15 set. 2007.

MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 38, p. 81–92, 2016.

MOHAMMADI, A. et al. Behavioral response of *Caenorhabditis elegans* to localized thermal stimuli. **BMC Neuroscience**, v. 14, n. 1, p. 66, 3 jul. 2013.

NAGHIZADEH, B.; MANSOURI, M. T.; GHORBANZADEH, B. Ellagic acid enhances the antinociceptive action of carbamazepine in the acetic acid writhing test with mice. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 1, p. 157–161, 2 jan. 2016.

PAN, Z. et al. Against NF- κ B/thymic stromal lymphopoietin signaling pathway, catechin alleviates the inflammation in allergic rhinitis. **International Immunopharmacology**, v. 61, p. 241–248, 1 ago. 2018.

PASSOS, F. F. DE B. et al. Involvement of Cholinergic and Opioid System in γ -Terpinene-Mediated Antinociception. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–9, 2015.

PAULA, J. A. M. DE et al. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of pimenta pseudocaryophyllus (Myrtaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 15, 2012.

PAULA, J. A. M. et al. Estudo farmacognóstico das folhas de Pimenta pseudocaryophyllus (Gomes) L.R. Landrum - Myrtaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 265–278, jun. 2008.

PINHEIRO, B. G. et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of Peperomia serpens (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, n. 2, p. 479–486, nov. 2011.

PINHO-RIBEIRO, F. A. et al. Protective effects of the flavonoid hesperidin methyl chalcone in inflammation and pain in mice: Role of TRPV1, oxidative stress, cytokines and NF- κ B. **Chemico-Biological Interactions**, v. 228, p. 88–99, 25 fev. 2015.

PORRECA, F.; NAVRATILOVA, E. Reward, motivation, and emotion of pain and its relief. **Pain**, v. 158, n. 4, p. 43–49, 2017.

PRADO, L. C. D. S. et al. The gastroprotective effects of Eugenia dysenterica (Myrtaceae) leaf extract: The possible role of condensed tannins. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 5, p. 722–730, 2014.

RAHMAN, S.; MALCOUN, A. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs, Cyclooxygenase-2, and the Kidneys. **Primary Care: Clinics in Office Practice**, v. 41, n. 4, p. 803–821, dez. 2014.

RAJ, G.; GEORGE, V.; SETHURAMAN, M. G. Chemical Analysis of Essential Oil from the Leaves of Eugenia argentea Bedd. **Journal of Essential Oil Research**, v. 23, p. 55–57, 2011.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory effects of Lafoensia pacari and ellagic acid in a murine model of asthma. **European journal of pharmacology**, v. 580, n. 1–2, p. 262–70, 2 fev. 2008.

SAMANTA, A.; DAS, G.; DAS, S. Roles of flavonoids in plants. **International Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, v. 6, n. 1, p. 12–35, 2011.

SANTOS, P. R. G. et al. Geleia de cagaita (Eugenia dysenterica DC.): desenvolvimento, caracterização microbiológica, sensorial, química e estudo da estabilidade. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 71, n. 2, p. 281–290, 2012.

SCHJERNING OLSEN, A.-M.; FOSBØL, E. L.; GISLASON, G. H. The Impact of NSAID Treatment on Cardiovascular Risk - Insight from Danish Observational Data. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, n. 2, p. 179–184, 1 ago. 2014.

SEPÚLVEDA, L. et al. Ellagic acid: Biological properties and biotechnological development for production processes. **African Journal of Biotechnology**, v. 10, n. 22, p. 4518–4523, 2011.

SHARMA, H.; GARG, M. A review of traditional use, phytoconstituents and biological activities of Himalayan yew, *Taxus wallichiana*. **Journal of Integrative Medicine**, v. 13, n. 2, p. 80–90, 1 mar. 2015.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p. 18–23, 2013.

SOBEH, M. et al. Chemical profiling of secondary metabolites of *Eugenia uniflora* and their antioxidant, anti-inflammatory, pain killing and anti-diabetic activities: A comprehensive approach. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 240, p. 111939, 10 ago. 2019.

SOBRAL - SOUZA, C. E. et al. Phytotoxicity reduction of the mercury chloride effect by natural products from *Eugenia jambolana* Lam.: A new strategy against the toxic metal pollution. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 170, p. 461–467, abr. 2019.

STROSBERG, A. D. Structure, function, and regulation of adrenergic receptors. **Protein Science**, v. 2, n. 8, p. 1198–1209, 1993.

TAHER, Y. A. et al. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. **The Libyan journal of medicine**, v. 10, p. 28685, 2015.

TELLES, M. P. DE C. et al. Divergência entre subpopulações de cagaiteira (*Eugenia dysenterica*) em resposta a padrões edáficos e distribuição espacial. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 36, n. 11, p. 1387–1394, nov. 2001.

THOMAZ, D. V. et al. Antioxidant and Neuroprotective Properties of *Eugenia dysenterica* Leaves. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2018, p. 1–9, 19 set. 2018.

TRESCOT, A. M. et al. Opioid pharmacology. **Pain Physician**, v. 11, n. 2, 2008.

VARDEH, D. et al. COX2 in CNS neural cells mediates mechanical inflammatory pain hypersensitivity in mice. **Journal of Clinical Investigation**, v. 119, n. 2, p. 287–94, 5 jan. 2009.

VIJAYAKARAN, K. et al. Arsenic decreases antinociceptive activity of paracetamol: Possible involvement of serotonergic and endocannabinoid receptors. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 2, p. 397–405, 2014.

VITEK, R. et al. Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*. **Natural Product Research**, v. 31, n. 16, p. 1930–1934, 18 ago. 2017.

WHITTLE, B. A. RELEASE OF A KININ BY INTRAPERITONEAL INJECTION OF CHEMICAL AGENTS IN MICE. **International journal of neuropharmacology**, v. 3, p. 369–78, set. 1964.

WOJTYNIAK, K.; SZYMAŃSKI, M.; MATŁAWSKA, I. *Leonurus cardiaca* L. (Motherwort): A Review of its Phytochemistry and Pharmacology. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1115–1120, 1 ago. 2013.

YANG, M. et al. Network Meta-Analysis Comparing Relatively Selective COX-2 Inhibitors Versus Coxibs for the Prevention of NSAID-Induced Gastrointestinal Injury. **Medicine**, v. 94, n. 40, p. e1592, out. 2015.

ZARUBIN, T.; HAN, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. **Cell Research**, v. 15, n. 1, p. 11–18, 2005.