

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS**

**DISSERTAÇÃO**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS METANÓLICOS DA *Annona  
tomentosa* R.E.Fr**

**LILIAN UCHOA CARNEIRO**

**2017**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS METANÓLICOS DA *Annona tomentosa*  
R.E.Fr**

**LILIAN UCHOA CARNEIRO**

*Sob a orientação do Professor*  
**Bruno Guimarães Marinho**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ  
Março de 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

C289a Carneiro, Lilian Uchoa, 1989-  
Avaliação das atividades antinociceptiva e anti  
inflamatória de extratos metanólicos da Annona  
tomentosa R.E.Pr / Lilian Uchoa Carneiro. - 2017.  
114 f.

Orientador: Bruno Guimarães Mariho Marinho.  
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Pós-graduação em Ciências  
Fisiológicas, 2017.

1. Annona tomentosa. 2. nocicepção. 3. opioide. 4.  
inflamação. I. Marinho, Bruno Guimarães Mariho, 1978-  
orient. II Universidade Federal Rural do Rio de  
Janeiro. Pós-graduação em Ciências Fisiológicas III.  
Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**LILIAN UCHOA CARNEIRO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no Curso de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração em Fisiologia e Farmacologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: / /

---

Dr. Bruno Guimarães Marinho. UFRRJ  
Orientador

---

Dr. Wellington da Silva Côrtes. UFRRJ

---

Dra. Mariana Martins Gomes Pinheiro. IFRJ

## **DEDICATÓRIA**

Ao grande Autor da Vida. Ele escreveu e continua escrevendo toda minha história; é a razão de tudo isto. Aos meus pais Alcemar e a Alexandra por todo amor, carinho e apoio. Ao meu amor, Eduardo, pelo companheirismo e incentivo. Às minhas irmãs, Acza Maressa e Ana Laís, mesmo à distância sei que se alegram com esta vitória.

## AGRADECIMENTOS

É muito boa a sensação de estar concluindo mais uma etapa na minha vida; entretanto sei que essa conclusão não se deve apenas a mim. Os resultados de um trabalho de pesquisa só são possíveis graças à contribuição e incentivo de várias pessoas, seja de maneira técnica, intelectual ou emocional. E é por este motivo que não posso deixar de expressar o meu agradecimento a todos os que de alguma maneira fizeram parte desta caminhada.

Agradeço primeiramente a Deus, pois me permitiu realizar este sonho e me deu forças todos os dias para não desistir jamais. Toda honra e toda glória seja dada a Ele.

Aos meus pais Alcemar e Alexandra, que me deram a base e sempre me incentivaram a crescer, o meu infinito agradecimento. Desde pequena, sempre ouvi que deveria ser a melhor aluna da classe; isto apenas me fortaleceu e me fez tentar não a ser a melhor, mas a sempre dar o melhor de mim. Nunca vou poder agradecer o suficiente pela decisão de que vocês queriam que eu estivesse presente no lar de vocês para nunca mais sair e obrigada pela confiança que sempre depositaram em mim.

Ao meu grande Amor, Eduardo, por ser tão importante na minha vida. Pelo apoio incondicional em todos os momentos que precisei, pelas horas de conversa me motivando e me fazendo crescer e valorizar tudo isto. Em muitos momentos você me fez acreditar que posso mais do que eu mesma imagino. Sua alegria, seu sorriso, amizade, paciência e compreensão foram definitivos na conclusão deste trabalho. Tenho muito a agradecer a Deus por ter feito você cruzar o meu caminho. E obrigada por ter feito deste sonho o nosso sonho!

Às minhas irmãs, Acza Maressa e Ana Laís, por todo o carinho que vocês têm por mim. Quero que saibam que sempre estarei à disposição para tudo o que vocês precisarem, e peço perdão por esta ausência que tanto nos angustia, mas em algum momento colheremos todos os frutos desta vitória. Não somos irmãs de sangue, mas o sentimento de amor que temos umas pelas outras nos faz ter laços de família! Amo vocês.

Ao meu nobre orientador, prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho, meu sincero agradecimento por esta valiosa orientação e por todo empenho dedicado à realização deste trabalho. Pelos seus incentivos de sempre, pela infinita paciência e por ter confiado em mim, mas principalmente por todo o compartilhar do seu conhecimento. Obrigada por suas constantes demonstrações de sabedoria e humildade. Você sempre será uma referência profissional e pessoal para o crescimento.

A todos os professores do PPGCF/UFRRJ por me proporcionar o conhecimento não apenas racional, mas a manifestação do caráter e afetividade da educação no processo de *formação profissional*, por tanto que se dedicaram a mim, não somente por terem me ensinado, mas por terem me feito aprender. A palavra mestre, nunca fará justiça aos *professores* dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Aos profs. Wellington e Mariana, pelo convite aceito para participar desta banca. Agradeço também às valorosas contribuições as quais permitiram o enriquecimento deste trabalho.

Às minhas colegas Raquel, Marissa, Fabiana, Poliana e Gabriela pelos auxílios, sugestões e críticas e também pelos momentos de descontração.

Às alunas de IC Bruna, Raisal, Milene e Yasmin pelas várias horas em que se dispuseram a me auxiliar na execução dos experimentos. Vocês foram essenciais em todos eles.

É um agradecimento especial à minha colega e que posso também chamar de amiga, Mirian, pela convivência, pelos momentos e tantas experiências compartilhadas. Não preciso falar muito, você sabe o quanto foi fundamental para realização deste projeto.

Ao secretário do PPGCF/UFRRJ, Franklin Rezende pelos conselhos e orientações tão valiosas desde o primeiro contato. Meu muito obrigada.

Agradeço ao professor Mário Geraldo de Carvalho e à Ilna Gomes da Silva pela parceria.

À CAPES, pela concessão do auxílio financeiro que viabilizou a realização deste trabalho.

E a todos que, direta ou indiretamente, participaram deste trabalho, o meu muito obrigada!

## RESUMO

CARNEIRO, Lilian Uchoa. **Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos metanólicos da *Annona tomentosa* R.E.Fr.** 2017. 114p. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

No presente estudo, testamos os extratos em metanol e suas partições da *Annona tomentosa*, espécie nativa do Brasil e popularmente conhecida como “araticum de moita” ou “araticum rasteiro”. O chá de suas folhas é utilizado na medicina popular como anti-inflamatório. Por esta razão, as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória da *A. tomentosa*, de São Luís-MA, foram avaliadas em camundongos. Os extratos em metanol das cascas do caule (ATCM) e das folhas (ATFM) foram preparados por maceração em metanol e suas partições em hexano (ATFM-H), diclorometano (ATFM-D), acetato de etila (ATFM-Ac) e butanol (ATFM-Bu) foram preparadas por partição líquido-líquido. O efeito antinociceptivo dos extratos e suas partições foram avaliados pelos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de retirada da cauda, enquanto os efeitos anti-inflamatórios foram avaliados pelos modelos do edema de pata e da bolsa de ar subcutânea. A partir do modelo de retirada da cauda foi avaliado o possível mecanismo de ação da partição ATFM-H utilizando antagonistas e inibidores, tais como naloxona, L-NAME, glibenclamida, atropina, naltrindol e norbinaltorfimina. A migração leucocitária e a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  foram avaliadas a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea estéril. O extrato em metanol ATFM (100 mg/kg) foi eficaz em reduzir as contorções abdominais em aproximadamente 49% (27,8  $\pm$  4,4 contorções abdominais) e dentre suas partições, ATFM-H e ATFM-D reduziram as contorções abdominais em 42,3% (31,3  $\pm$  5,9 contorções abdominais) e 34% (35,8  $\pm$  7,7 contorções abdominais), respectivamente, em relação ao grupo controle negativo. ATFM-H apresentou efeito antinociceptivo central com envolvimento de receptores opioides do tipo delta, no modelo de retirada da cauda, e sem prejuízo da atividade locomotora espontânea dos animais no modelo do campo aberto, em relação ao grupo controle negativo. A partição ATFM-D reduziu significativamente o edema de pata induzido tanto por carragenina (100 mg/kg) em 39,3%, histamina (50 e 100 mg/kg) e serotonina (10, 50 e 100 mg/kg). O ATFM-D inibiu a migração de leucócitos totais para a bolsa de ar estéril, nas doses de 50 e 100 mg/kg, em 75,8% (3,91  $\pm$  1,2  $\times$  10<sup>6</sup>/mL) e 92,9% (1,15  $\pm$  0,5  $\times$  10<sup>6</sup>/mL), respectivamente, e a produção de TNF- $\alpha$  nas doses de 50 e 100 mg/kg em aproximadamente 43% (740  $\pm$  85,7 pg/mL) e 67% (433,8  $\pm$  52,1 pg/mL), respectivamente, em relação ao grupo controle PBS. O ATFM-D também reduziu a produção de IL-1 $\beta$  nas doses de 50 e 100mg/kg em aproximadamente 25% (452,3  $\pm$  52,5 pg/mL) e 35% (388,7  $\pm$  42,3 pg/mL), respectivamente, em relação ao grupo controle PBS. Conforme demonstrado pelos métodos empregados, podemos concluir que o extrato em metanol de folhas da *A. tomentosa* apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório nos modelos de dor e inflamação aguda, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos.

**Palavras-chave:** *Annona tomentosa*; nocicepção; opioide; inflamação.

## ABSTRACT

CARNEIRO, Lilian Uchoa. **Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of methanolic extracts of *Annona tomentosa* R.E.Fr.** 2017. 104p. Dissertation (Master of Physiological Sciences). Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Rural Federal University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

In this study, we tested the methanolic extracts and their partitions of *Annona tomentosa*, native specie of Brazil and popularly known as “araticum rasteiro” or “araticum de moita”. The tea from its leaves has been used as anti-inflammatory by native community. For this reason, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *A. tomentosa*, from São Luís-MA, were evaluated in mice. The methanolic extracts from stem bark (ATCM) and leaves (ATFM) were prepared by maceration with methanol and their partitions from hexane (ATFM-H), dichloromethane (ATFM-D), ethyl acetate (ATFM-Ac) and butanol (ATFM-Bu) were prepared by liquid-liquid partition. The antinociceptive effect of extracts and fractions were evaluated by abdominal writhing and tail-flick tests, while the anti-inflammatory effects were evaluated by paw oedema and air pouch tests. From the tail flick, we evaluated by the possible action mechanism of *A. tomentosa* using antagonists and inhibitors, such as naloxone, L-NAME, glibenclamide, atropine, naltrindole and nor-binaltorphimine. The leukocyte migration and production of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  were evaluated from the air pouch test. The methanolic extract ATFM (100 mg/kg) reduced abdominal writhing by approximately 49% ( $27,8 \pm 4,4$  abdominal writhing). Among its fractions only ATFM-H and ATFM-D were able to reduce the abdominal writhing 42,3% ( $31,3 \pm 5,9$  abdominal writhing) and 34% ( $35,8 \pm 7,7$  abdominal writhing), respectively, in relation to negative control group. The ATFM-H showed central antinociceptive effect from the involvement of the delta opioid receptors, in the tail flick test, without promote alterations in the locomotor activity of the mice in the open field test, in relation to negative control group. The partition ATFM-D was effective in decreasing paw oedema induced by carrageenan (100 mg/kg), histamine (50 and 100 mg/kg) and serotonin (10, 50 and 100 mg/kg). O ATFM-D inhibited leukocyte migration to air pouch, at doses 50 and 100 mg/kg, in 75,8% ( $3,91 \pm 1,2 \times 10^6/\text{mL}$ ) and 92,9% ( $1,15 \pm 0,5 \times 10^6/\text{mL}$ ), and TNF- $\alpha$  production at doses of 50 and 100 mg/kg by approximately 43% ( $740 \pm 85,7$  pg/mL) and 67% ( $433,8 \pm 52,1$  pg/mL), respectively, in relation to PBS control group. The ATFM-D also reduced IL-1 $\beta$  production at doses of 50 and 100 mg/kg by approximately 25% ( $452,3 \pm 52,5$  pg/mL) and 35% ( $388,7 \pm 42,3$  pg/mL), respectively, in relation to PBS control group. As demonstrated by methods employed, these results demonstrate that methanolic extract of leaves from *A. tomentosa* presented antinociceptive and anti-inflammatory effects, suggesting its potential for therapeutic purposes.

**Keywords:** *Annona tomentosa*; nociception; opioid; inflammation.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Esquema geral de partição e separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....	6
<b>Figura 2</b> – <i>Annona tomentosa</i> R. E. Fr no dia da colheita do material.....	8
<b>Figura 3</b> – Cascata do ácido araquidônico.....	17
<b>Figura 4</b> – A estimulação nociva do nociceptor nas terminações nervosas sensoriais causa dor nociceptiva, a estimulação patológica do axônio, do gânglio da raiz dorsal ou de neurônios no sistema nervoso central causa dor neuropática.....	24
<b>Figura 5</b> – As fibras nociceptivas terminam no corno dorsal da medula espinal.....	28
<b>Figura 6</b> – As duas principais vias de ascendência da informação nociceptiva da medula espinal ao córtex somatossensorial.....	29
<b>Figura 7</b> – Mecanismos da dor inflamatória.....	31
<b>Figura 8</b> – Protocolo experimental do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	41
<b>Figura 9</b> – Modelo de retirada da cauda. a) Protocolo experimental; b) Fórmula utilizada para a quantificação da antinocicepção.....	42
<b>Figura 10</b> – Protocolo experimental do modelo de campo aberto.....	43
<b>Figura 11</b> – Protocolo experimental do modelo do edema de pata induzido por carragenina.....	44
<b>Figura 12</b> – Protocolo experimental do modelo do edema de pata induzido por histamina e serotonina.....	44
<b>Figura 13</b> – Protocolo experimental do modelo da bolsa de ar subcutânea estéril.....	45
<b>Figura 14</b> – Efeitos da administração oral prévia dos extratos em metanol das cascas do caule e das folhas da <i>Annona tomentosa</i> (ATCM e ATFM, respectivamente) na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (*p < 0,05; **p < 0,01 e ***p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, ATCM e ATFM, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....	47

**Figura 15** – Efeitos da administração oral prévia das partições do extrato em metanol das folhas (ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Ac e ATFM-Bu) da *Annona tomentosa*, na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg), no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e as partições do ATFM, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....48

**Figura 16** – Efeitos da administração oral prévia de diferentes doses do ATFM-H (10, 50 e 100 mg/kg), controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e a partição em hexano em doses crescentes, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....49

**Figura 17** – Efeitos da administração oral prévia do ATFM-H e ATFM-D na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (8,15 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina, ATFM-H e ATFM-D, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....51

**Figura 18** – Efeitos da administração oral prévia de doses crescentes do ATFM-H (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada e morfina (8,15 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e a partição em hexano em doses crescentes, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....52

**Figura 19** – Influência da administração prévia de naloxona (N), N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), atropina (Atro), glibenclamida (Gli), naltrindol (Nal) e norbinatorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido por ATFM-H (100 mg/kg), no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram tratados por via intraperitoneal com glibenclamida (5 mg/kg), L-NAME (3 mg/kg) e atropina (5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da partição. Em B, os animais foram tratados por via

intraperitoneal com naloxona (5 mg/kg), naltrindol (3 mg/kg) e nor-binaltorfimina (3 mg/kg) 15 minutos antes da administração da partição. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com a partição isoladamente e combinada com naloxona, L-NAME, atropina, glibenclamida, naltrindol e nor-binaltorfimina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....53

**Figura 20** – Avaliação do ATFM-H no modelo do campo aberto. Controle, veículo, ATFM-H (100 mg/kg) e morfina (8,15 mg/kg) foram administrados, por via oral, 60 minutos antes da submissão dos animais ao experimento. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6) do número de quadrados totais percorridos pelos animais. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e ATFM-H, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.....55

**Figura 21** – Efeito da administração oral prévia das partições do ATFM no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Em A, os animais foram pré-tratados oralmente com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg, via subcutânea), e as partições ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Bu e ATFM-Ac na dose de 100mg/kg. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A carragenina foi aplicada na pata esquerda traseira dos animais em todos os grupos e a diferença de volume foi feita em comparação com a pata direita traseira que recebeu água destilada. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6) do volume de edema de pata. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e as partições, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....57

**Figura 22** – Efeito do ATFM-D no modelo do edema de pata induzido por histamina. Em A, os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A histamina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com água destilada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com

dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....59

**Figura 23** – Efeito do ATFM-D, em doses crescentes, no modelo do edema de pata induzido por serotonina. Em A, os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A serotonina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com água destilada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....61

**Figura 24** – Efeito do ATFM-D na migração de leucócitos totais a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do número de leucócitos totais. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.....63

**Figura 25** – Efeito de doses crescentes de ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada, veículo e dexametasona (2,25 mg/kg) sobre a produção e/ou liberação de TNF- $\alpha$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os tratamentos foram realizados por via oral, exceto a dexametasona a qual foi administrada por via subcutânea. Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas soluções de PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6). A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001)

foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....65

**Figura 26** – Efeito de doses crescentes de ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada, veículo e dexametasona (2,25 mg/kg) sobre a produção e/ou liberação de IL-1 $\beta$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os tratamentos foram realizados por via oral, exceto a dexametasona que foi administrada por via subcutânea. Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas soluções de PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.....66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – As ações dos principais mediadores do processo inflamatório.....	15
<b>Tabela 2</b> – Classes de nociceptores.....	26
<b>Tabela 3</b> – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com ATCM e ATFM.....	48
<b>Tabela 4</b> – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com as diferentes partições do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i> .....	49
<b>Tabela 5</b> – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com doses crescentes da partição em hexano do extrato em metanol de folhas da <i>Annona tomentosa</i> .....	50
<b>Tabela 6</b> – Efeito das partições ATFM-H e ATFM-D no modelo de retirada de cauda.....	51
<b>Tabela 7</b> – Efeito do ATFM-H em doses crescentes no modelo de retirada da cauda...52	
<b>Tabela 8</b> – Influência da administração prévia de glibenclamida, L-NAME, atropina, naloxona, naltrindol e nor-binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pela partição em hexano do extrato em metanol de <i>Annona tomentosa</i> no modelo de retirada de cauda.....	54
<b>Tabela 9</b> – Número de quadrados percorridos a partir do modelo do campo aberto.....	55
<b>Tabela 10</b> – Efeito das partições do extrato em metanol de folhas da <i>Annona tomentosa</i> no modelo de edema de pata induzido por carragenina.....	58
<b>Tabela 11</b> – Efeito da partição em diclorometano do extrato em metanol de folhas da <i>Annona tomentosa</i> no modelo de edema de pata induzido por histamina.....	60
<b>Tabela 12</b> – Efeito da partição em diclorometano do extrato em metanol de folhas da <i>Annona tomentosa</i> no modelo do edema de pata induzido por serotonina.....	62

**Tabela 13** – Efeito da partição em diclorometano do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa* sobre a migração leucocitária no modelo da bolsa de ar subcutânea.....64

**Tabela 14** – Efeito do ATFM-D em doses crescentes sobre a produção e/ou liberação de TNF- $\alpha$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea.....66

**Tabela 15** – Efeito do ATFM-D em doses crescentes sobre a produção e/ou liberação de IL-1 $\beta$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea.....67

## LISTA DE ABREVIÇÕES, SIGLAS OU SÍMBOLOS

<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AIEs</b>	Anti-inflamatórios esteroidais
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não esteroidais
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>ASC</b>	Área sob a curva
<b>ATCM</b>	Extrato em metanol do caule da <i>Annona tomentosa</i>
<b>ATFM</b>	Extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i>
<b>ATFM-Ac</b>	Partição em acetato de etila do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i>
<b>ATFM-Bu</b>	Partição em butanol do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i>
<b>ATFM-D</b>	Partição em diclorometano do extrato metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i>
<b>ATFM-H</b>	Partição em hexano do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i>
<b>CEUA</b>	Comissão de Ética no Uso de Animais
<b>CLRs</b>	Receptores de lectina tipo C
<b>cm</b>	Centímetros
<b>COXs</b>	Ciclo-oxigenases
<b>COX-1</b>	Ciclo-oxigenase 1
<b>COX-2</b>	Ciclo-oxigenase 2
<b>COX-3</b>	Ciclo-oxigenase 3
<b>DAMPs</b>	Padrões moleculares associados ao dano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>ED<sub>50</sub></b>	Dose correspondente a 50% do efeito máximo de uma droga
<b>EPM</b>	Erro padrão da média
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>g</b>	Gramas
<b>H<sup>+</sup></b>	Íon hidrogênio
<b>ICAM 1</b>	Molécula de adesão intercelular 1
<b>ICBS</b>	Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde
<b>ILs</b>	Interleucinas
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 $\beta$

<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>IL-10</b>	Interleucina 10
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>K<sup>+</sup></b>	Íon potássio
<b>K<sub>ATP</sub></b>	Canal de potássio dependente de ATP
<b>kg</b>	Kilograma
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	Fosfato de potássio monobásico
<b>IASP</b>	International Association for the Study of Pain
<b>L-NAME</b>	N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster
<b>LOXs</b>	Lipoxigenases
<b>LPS</b>	Lipopolissacarídeo
<b>LTs</b>	Leucotrienos
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>LTC<sub>4</sub></b>	Leucotrieno C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	Leucotrieno D <sub>4</sub>
<b>LTE<sub>4</sub></b>	Leucotrieno E <sub>4</sub>
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatraente de macrófagos
<b>Mg</b>	Miligrama
<b>min</b>	Minutos
<b>mL</b>	Mililitro
<b>mM</b>	Milimol
<b>N</b>	Número de animais por grupo
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub></b>	Fosfato dissódico
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NLRs</b>	Receptores tipo NOD
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Enzima óxido nítrico sintase
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde
<b>PAF</b>	Fator ativador de plaquetas
<b>PAMPs</b>	Padrões moleculares associados a patógenos
<b>PBS</b>	Tampão fosfato salina
<b>PGs</b>	Prostaglandinas

<b>PGD<sub>2</sub></b>	Prostaglandina D <sub>2</sub>
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PRRs</b>	Receptores de reconhecimento de padrões
<b>RIG</b>	Ácido retinóico induzível
<b>RLRs</b>	Receptores tipo RIG I ácido retinoico induzível
<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SBED</b>	Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor
<b>s.c.</b>	Via subcutânea
<b>SNC</b>	Sistema nervoso central
<b>TGF-β</b>	Fator de crescimento transformante beta
<b>TLRs</b>	Receptores tipo <i>Toll</i>
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TNF-α</b>	Fator de necrose tumoral alfa
<b>TXs</b>	Tromboxanos
<b>TXA<sub>2</sub></b>	Tromboxano A <sub>2</sub>
<b>UFRRJ</b>	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
<b>VCAM 1</b>	Molécula de adesão vascular 1
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>μL</b>	Microlitros

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	1
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	3
2.1 Plantas Medicinais e Produtos Naturais	3
2.1.1 Família Annonaceae e o gênero <i>Annona</i>	7
2.2 Inflamação	8
2.2.1 O processo inflamatório	10
2.2.2 Controle farmacológico da inflamação	18
2.3 Dor e Nocicepção	21
2.3.1 Classificação de dor	22
2.3.2 Fisiopatologia da dor	25
2.3.4 Dor inflamatória	30
2.3.5 Opioides	32
2.3.6 Controle farmacológico da dor	34
<b>3 OBJETIVOS</b>	36
3.1 Objetivo Geral	36
3.2 Objetivos Específicos	36
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	37
4.1 Coleta da Planta	37
4.2 Preparo e Partição dos Extratos em Metanol	37
4.3 Animais	38
4.4 Fármacos, Drogas e Reagentes	38
4.5 Tratamentos e Preparo das Substâncias	38
4.6 Modelos de Avaliação da Atividade Antinociceptiva	41
4.6.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	41
4.6.2 Modelo de retirada da cauda	41
4.6.3 Modelo do campo aberto	43
4.7 Modelos de Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	43
4.7.1 Modelo do edema de pata	43
4.7.2 Modelo da bolsa de ar subcutânea estéril	44
4.7.2.1 Contagem de células na cavidade subcutânea estéril	45
4.7.2.2 Quantificação de citocinas	46
4.8 Tratamento Estatístico	46
<b>5 RESULTADOS</b>	47
5.1 Modelos de Avaliação da Atividade Antinociceptiva	47
5.1.1 Efeito dos extratos em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i> e suas partições no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético	47
5.1.2 Efeito das partições do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i> no modelo de retirada da cauda	50

5.1.3 Efeito da partição ATFM-H no modelo do campo aberto	54
5.2 Modelos de Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	56
5.2.1 Efeito das partições do extrato em metanol das folhas da <i>Annona tomentosa</i> no modelo do edema de pata	56
5.2.2 Efeito da partição ATFM-D sobre a migração de leucócitos totais no modelo da bolsa de ar subcutânea estéril	62
5.2.3 Efeito da partição ATFM-D sobre a produção e/ou liberação de citocinas no modelo da bolsa de ar subcutânea estéril	64
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>68</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>79</b>
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O homem utiliza-se de produtos naturais, particularmente da flora, para fins medicinais, desde os primórdios da humanidade. Existem indícios nas civilizações mais antigas do uso de plantas medicinais, sendo considerada uma das práticas mais remotas que o homem utiliza para curar, prevenir e tratar doenças, servindo como importante fonte de substâncias com atividades biológicas.

O expansivo uso de medicamentos à base de plantas medicinais e o próprio conhecimento popular trazem consigo a necessidade de estudos experimentais para esclarecer e confirmar as informações sobre as ações das plantas e caracterizar as substâncias biologicamente ativas e/ou tóxicas, visando minimizar os efeitos adversos e toxicológicos, haja vista que esse uso deve ser confiável e seguro.

Alguns fármacos analgésicos “clássicos”, como os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) têm suas origens em produtos naturais que foram utilizados por séculos. Porém, os inúmeros efeitos indesejados, como depressão respiratória, irritação gástrica, sedação e constipação intestinal, além da tolerância a opioides e dependência, limita o uso desses fármacos e impulsiona uma busca contínua por substâncias mais eficazes e potentes e que desencadeiem efeitos adversos mínimos.

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, taninos e lignanas tem sido objeto de incessantes estudos, em que já foram comprovadas as ações farmacológicas destas substâncias através de testes pré-clínicos em animais.

A *Annona tomentosa* é uma espécie pertencente ao gênero *Annona*, da família Annonaceae, e conhecida popularmente como “araticum de moita” ou “araticum rasteiro”. O chá das folhas é utilizado na medicina popular para tratamento de doenças de origem inflamatória. Estudos com outras espécies do gênero *Annona* revelaram a presença de compostos com atividade biológica, tais como acetogeninas, alcaloides e flavonoides. Em três espécies da família Annonaceae foram comprovados os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório, utilizadas pela medicina popular contra febre, reumatismo e doenças parasitárias.

O processo inflamatório consiste numa resposta complexa gerada pela presença de um agente causador da lesão e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente nocivo, de ordem

física, mecânica, biológica ou química. Inúmeros mediadores formados durante o processo inflamatório e responsáveis pelos eventos vasculares da inflamação podem estimular e sensibilizar os neurônios sensoriais aferentes primários, contribuindo para o aparecimento da dor.

A dor corresponde a uma resposta subjetiva que o organismo apresenta quando é submetido a algum estímulo potencialmente nocivo. Na maioria das vezes esse tipo de reação configura-se como uma função protetora, representando, em muitos casos, o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças, porém, quando persistente, provoca reações emocionais negativas, tornando-se debilitante e causadora de sofrimento, e trazendo consigo prejuízos nas relações sociais e econômicas. A dor deve, portanto, ser rápida e efetivamente controlada e tratada.

Em função do que foi exposto acima e pelo fato de não existirem evidências científicas para os efeitos da *Annona tomentosa* R.E.Fr, avaliamos o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório, sob condições agudas, da *A. tomentosa*, sendo este estudo pioneiro na busca e comprovação destas atividades biológicas nesta espécie.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Plantas medicinais e Produtos Naturais

A fitoterapia é a base da farmacologia moderna; é também o mais antigo sistema de medicina do mundo. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como "toda e qualquer espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada para fins terapêuticos" (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2003). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de fármacos, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 1998).

As aplicações médicas tradicionais baseadas em plantas são práticas comuns entre as comunidades desde milhares de anos antes de Cristo, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Contudo, a busca por constituintes ativos presentes em plantas medicinais começou somente no século 19. Em 1806, Friedrich Sertürner foi o pioneiro quando isolou o alcaloide morfina, analgésico de ação central, do ópio (*Papaver somniferum*): um evento que levou a uma busca contínua por outros medicamentos derivados de plantas. Em 1824, Pierre-Jean Robiquet isolou a codeína, um agente analgésico e antitussígeno, e em 1848, George Merck Fraz isolou o alcaloide anti-espasmódico papaverina; ambas as substâncias também foram isoladas a partir do ópio. Outros exemplos importantes de constituintes ativos isolados de plantas medicinais incluem a atropina (antagonista muscarínico), isolada da *Atropa belladonna* por Mein, em 1831; a cafeína obtida a partir do *Coffea arabica* por Runge, em 1820; a digoxina (digitálico) isolada por Claude-Adolphe Nativelle, em 1869, da *Digitalis lanata*; e o curare (bloqueador neuromuscular) isolado por Winstersteiner e Dutcher, em 1943, do *Chondrodendron tomentosum*, entre muitos outros exemplos (DUTRA et al., 2016).

A descoberta da salicina (analgésico e antipirético) por Rafaele Piria, em 1832, a partir da *Salix alba*, representa o marco histórico no desenvolvimento da indústria farmacêutica global. Em 1839, a primeira modificação estrutural da salicina foi realizada, produzindo o ácido salicílico para ser usado no tratamento da artrite reumatoide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou o ácido acetilsalicílico, em 1897 (DUTRA et al., 2016).

Notavelmente, os compostos derivados de plantas são atualmente empregados na terapia moderna, além de desempenhar um importante papel na síntese ou semissíntese de moléculas com distintas atividades biológicas. Estima-se que 30% das medicações terapêuticas disponíveis sejam derivadas de fontes naturais, particularmente de plantas e microrganismos. Em algumas áreas terapêuticas, tais como a oncologia, a quantidade de medicamentos derivados de plantas alcança 60% (CALIXTO, 2000).

Muitas classes de princípios ativos são isoladas de plantas medicinais brasileiras. De fato, o Brasil possui uma biodiversidade extremamente rica, contabilizando aproximadamente 20% do total de espécies conhecidas no planeta, as quais são encontradas em vários biomas importantes, tais como a floresta Amazônica e a Mata Atlântica (VALLI et al., 2013). A população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas. Isto chamou a atenção de pesquisadores brasileiros e algumas companhias farmacêuticas brasileiras para estudar plantas medicinais nativas e seus princípios ativos (DUTRA et al., 2016).

A maioria dos princípios ativos de importância farmacológica encontrada nos extratos vegetais, de modo geral, é oriunda de uma variedade de metabólitos secundários os quais desempenham um importante papel na adaptação das plantas ao seu ambiente. Estas substâncias estão distribuídas diferencialmente entre grupos taxonômicos limitados dentro do reino vegetal. Em contrapartida, os metabólitos primários são encontrados em todas as plantas e realizam papéis metabólicos que são essenciais e usualmente evidentes (CROTEAU et al., 2000).

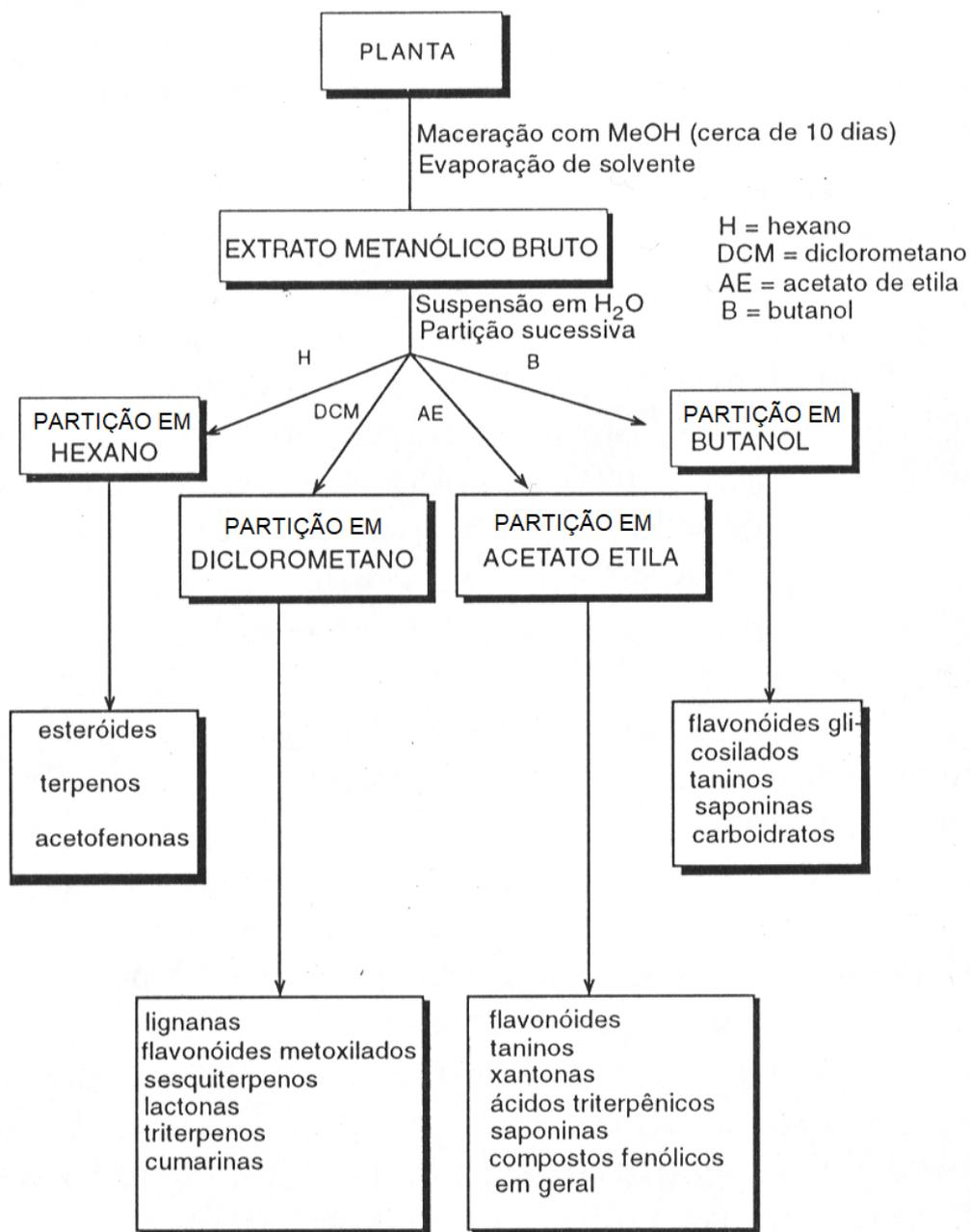
A diversidade química dos metabólitos secundários isolados é muito grande, com compostos pertencentes a várias classes químicas diferentes, incluindo terpenoides, alcaloides, flavonoides, iridoides, lignanas, fenilpropanoides, derivados do ácido benzoico, piranos, cromanos, e outras classes. As propriedades farmacológicas dos compostos isolados também são diversificadas, compreendendo inibidores da acetilcolinesterase, antiangiogênicos, antibacterianos, antifúngicos, antioxidantes, antitripanossômicos, antiulcerogênicos, ansiolíticos, analgésicos, anti-inflamatórios, agentes citotóxicos e inibidores de proteases (VALLI et al., 2013).

Um dos fatores que contribui consideravelmente para o crescimento da fitoterapia consiste na evolução dos estudos científicos, particularmente os estudos químicos e farmacológicos, que comprovam, cada vez mais, a eficácia das plantas medicinais empregadas na medicina popular com finalidades terapêuticas. Entretanto, a

necessidade de se chegar aos compostos puros responsáveis pelos efeitos biológicos apresentados pelos extratos, leva a uma obrigatória integração entre a Botânica, a Química e a Farmacologia Molecular, cujo elo pode levar à obtenção de substâncias naturais ou sintéticas de grande interesse químico-medicinal (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

As preparações vegetais têm uma característica muito especial que as distinguem de drogas: uma única planta pode conter um grande número de fitocompostos bioativos, quanto mais em uma combinação de plantas. Essa complexidade é um dos desafios mais importantes na tentativa de identificar um único composto bioativo no universo enorme que inclui um único extrato bruto (MENDONÇA-FILHO, 2006).

Existem várias metodologias descritas para o preparo de extratos vegetais, com o objetivo de isolar os seus constituintes químicos. Um dos métodos mais utilizados para a análise químico-farmacológica é o preparo de um extrato em metanol (metanol/água 50/50, v/v). Para estudos de efeitos biológicos, o metanol é o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridades crescentes, como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, visando uma semipurificação das substâncias através de suas polaridades. No sentido de localizar os princípios ativos, todos os extratos semipuros devem ser testados e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para isolamento e purificação dos compostos (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998). A Figura 1 ilustra os procedimentos descritos e indica as prováveis classes de metabólitos encontrados nas diferentes partições.



**Figura 1 – Esquema geral de partição e separação dos principais metabólitos secundários presentes em plantas. (FONTE: Adaptado de CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).**

O potencial terapêutico de plantas medicinais e seus metabólitos secundários têm sido objeto de estudo, por meio da avaliação das ações farmacológicas em testes pré-clínicos em animais de laboratório, visando a possibilidade de futuramente virem a ser aproveitados como agentes medicinais e a comprovação do uso das plantas com segurança na medicina popular. A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, partições e extratos totais de partes de uma planta específica.

### 2.1.1 Família Annonaceae e o gênero *Annona*

Annonaceae é uma família de plantas que possui aproximadamente 162 gêneros reconhecidos (CHATROU et al., 2012) e de 2300 a 2500 espécies (CARBALLO et al., 2010). Somente 4 gêneros desta família – *Annona*, *Rollinia*, *Uvaria* e *Asiminia* – produzem frutas comestíveis, tais como as anonáceas (RUIZ E MORETT, 1997).

Vários relatos têm caracterizado a atividade farmacológica de plantas do gênero *Annona* devido à presença de compostos bioativos, como flavonoides, acetogeninas e alcaloides encontrados em raízes, folhas, cascas, sementes e frutos (DI STASI e HIMURA-LIMA, 2002; RINALDI, 2007).

Recentemente alguns estudos farmacológicos apontaram o potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório das espécies *Annona coriacea*, *Annona diversifolia* e *Polyalthia longifolia*, confirmando o uso popular destas espécies no combate à febre, cefaleias, estomatite, reumatismo e doenças parasitárias (SOUSA, 2003; SOUSA et al., 2007; CARBALLO et al., 2010; SAVITHRAMMA et al., 2011; JOTHY et al., 2012; MONIRUZZAMAN et al., 2015).

A *Annona tomentosa* (Figura 2) é uma espécie nativa do Brasil, não-endêmica, com domínios fitogeográficos na Amazônia, Cerrado e Pantanal e distribuição geográfica nos estados do Pará, Rondônia, Tocantins, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e São Paulo (MAAS, LOBÃO e RAINER, 2017). Botanicamente, a *Annona tomentosa* R. E. Fr caracteriza-se como um arbusto de cerca de 1,2 m de altura com ramos densamente tomentosos, cobertos de lenticelas e lisos. Apresenta flores terminais ou sub-axilares de cores que variam de creme a alvas, dependendo da posição das pétalas, e floresce no período de novembro a dezembro. A *A. tomentosa* R. E. Fr. produz frutos comestíveis, ovoides, de 2,5 a 4 cm de comprimento e de 2 a 3 cm de diâmetro, popularmente conhecidos como “araticum de moita” ou “araticum rasteiro” e o chá das folhas é utilizado pela comunidade nativa por seu efeito anti-inflamatório (GOTTSBERGER, 1994; MELLO-SIVA; PIRANI, 2003; MELLO SILVA et al., 2012).

Não existem evidências científicas para os efeitos da *A. tomentosa* R.E.Fr, especialmente aqueles relacionados ao controle da dor e da inflamação. Há um estudo fitoquímico da *A. tomentosa* na literatura relatando a presença do flavonoide kaempferol-3-O-ramnosilglucosídeo, quercetina-3-O-glucosídeo, quercetina-3-O-ramnosilglucosídeo e luteolina-7-O-glucosídeo encontrados em extratos foliares desta planta (SANTOS e SALATINO, 2000).



**Figura 2 – *Annona tomentosa* R.E.Fr no dia da colheita do material. (Arquivo pessoal da doutoranda do Programa de Pós-Graduação em Química, da UFRRJ, Ilna Gomes da Silva).**

## **2.2 Inflamação**

Sendo a homeostase uma propriedade fundamental dos sistemas biológicos responsável por preservar sua estabilidade através da manutenção de variáveis reguláveis numa faixa aceitável (CHOVATIYA e MEDZHITOV, 2014), é essencial para a sobrevivência dos organismos a habilidade de se livrar de tecidos danificados, necróticos ou invasores, tais como os microrganismos. O processo que capacita o organismo a se defender de uma potencial infecção ou injúria tecidual é a inflamação (KUMAR et al., 2010).

O processo inflamatório é uma resposta complexa, dinâmica, multimediada e altamente regulado por uma sequência de eventos que podem ser provocados por uma variedade de estímulos, incluindo patógenos, agentes químicos, mecânicos e térmicos e respostas autoimunes (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005). Este processo envolve componentes vasculares, celulares e uma variedade de mediadores solúveis (CRUVINEL et al., 2010).

A resposta inflamatória é gerada pela presença de um agente provocador da inflamação e é fundamentalmente uma resposta de proteção, cuja finalidade é livrar o organismo de tal agente etiológico (microrganismos e/ou suas toxinas, trauma físico) e das consequências dessa lesão, como células e tecidos necróticos. As principais características do processo inflamatório incluem: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular, formação de exsudato, migração de leucócitos e seu acúmulo no local da inflamação, formação de espécies reativas de oxigênio (EROs), liberação de fatores de crescimento e a geração de um novo tecido funcional (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2010).

A vasodilatação local, o aumento do fluxo sanguíneo, o aumento da permeabilidade vascular, o influxo de células no local da atividade inflamatória e a presença de mediadores inflamatórios produzidos como resultado geram os sinais cardinais da inflamação (CALDER, 2015). Estes sinais foram descritos, a princípio, por Celsius, um escritor egípcio, no primeiro século d.C., que listou quatro sinais cardinais tipicamente mais proeminentes na inflamação aguda que na crônica: *rubor* (vermelhidão), *tumor* (inchaço), *calor* (aquecimento) e *dolor* (dor). No século XIX, Rudolf Virchow adicionou à lista um quinto sinal clínico: a perda de função (KUMAR et al., 2010).

Embora, no passado, a inflamação tenha sido primariamente associada à infecção e injúria tecidual, evidências mais recentes sugerem que uma gama muito mais ampla de doenças apresentem marcadores indicadores de inflamação, como por exemplo, o fator reumatoide, considerado um marcador sorológico clássico utilizado no diagnóstico da artrite reumatoide (SCHMID-SCHONBEIN, 2006; NASS et al., 2017).

Dependendo da natureza do estímulo e da efetividade da reação inicial em eliminar o estímulo e os tecidos danificados, a inflamação pode ser aguda ou crônica. A inflamação aguda é rápida no início e de pouca duração, persistindo por horas ou dias. Suas principais características são: fluxo sanguíneo aumentado, extravasamento de fluido e proteínas plasmáticas e a migração de leucócitos para o local da infecção ou injúria. As reações inflamatórias agudas podem ser disparadas por uma série de estímulos, tais como: infecções (neste caso, o principal objetivo da inflamação é remover o patógeno e/ou suas toxinas), necrose tecidual (como no infarto do miocárdio, trauma e injúria de origem física ou química), corpos estranhos e reações autoimunes (KUMAR et al, 2010).

A inflamação crônica pode ser decorrente de uma progressão da inflamação aguda incorretamente tratada e em alguns casos, sua etiologia é desconhecida. Este tipo de inflamação é de longa duração e suas principais características são: infiltração de células mononucleares, que incluem linfócitos, macrófagos e células plasmáticas, destruição tecidual induzida pelo agente agressor ou pelas células inflamatórias, e tentativa de cura pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, realizada pela proliferação de vasos sanguíneos (angiogênese) e, em particular, fibrose (JAGADISH et al., 2016).

Enquanto as causas da inflamação aguda estão fortemente associadas à infecção e injúria tecidual, a inflamação crônica acompanha muitos estados patológicos sem infecção ou injúria (CHOVATIYA e MEDZHITOV, 2014), tais como estresse, excesso de tecido adiposo em humanos e animais, diabetes tipo 2, aterosclerose e doenças neurodegenerativas (CHOVATIYA e MEDZHITOV, 2014; KOTAS e MEDZHITOV, 2015; CASTRO; MACEDO-DE LA CONCHA; PANTOJA-MELÉNDEZ, 2016; CHESNOKOVA; PECHNICK; WAWROWSKY, 2016).

Embora os mediadores formados durante o processo inflamatório devam desempenhar um papel primário de defender o organismo, quando produzidos inadequadamente ou de maneira desregulada, os mesmos podem causar danos aos tecidos. Alguns destes mediadores podem escapar do local da inflamação em direção à corrente sanguínea e exercer efeitos sistêmicos. Por exemplo, a interleucina 6 (IL-6) induz a síntese hepática de proteínas de fase aguda, como a proteína C reativa; o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) induz efeitos catabólicos no músculo esquelético, tecidos adiposo e ósseo; e a interleucina 1 (IL-1) pode agir no hipotálamo e causar febre (CALDER et al., 2009; CHALARIS et al., 2011).

### **2.2.1 O processo inflamatório**

A resposta inflamatória envolve a interação entre muitos tipos celulares, como células endoteliais, monócitos, macrófagos, neutrófilos, basófilos e a produção de um grande número de mediadores inflamatórios, tais como citocinas, eicosanoides, cininas e fatores do complemento (CALDER, 2015), sendo o sistema imune inato o principal contribuinte na restauração da homeostase na inflamação aguda induzida por infecção microbiana ou injúria tecidual. O sistema imune inato também é importante na ativação da imunidade adquirida (AKIRA; UEMATSU; TAKEUCHI, 2006).

Na intenção de manter a homeostase, sensores especializados constantemente monitoram os valores das variáveis reguláveis do organismo. Os sensores conhecidos da homeostase tecidual são especializados em detectar mudanças extremas, tais como a infecção e a injúria tecidual. Estes sensores incluem células imunes residentes teciduais (macrófagos e mastócitos) bem como neurônios somatossensoriais (por exemplo, as fibras nociceptivas C) capazes de monitorar e controlar a homeostase tecidual em situações de infecção e injúria (CHOVATIYA e MEDZHITOV, 2014).

De um modo geral, pode-se dizer que a resposta inflamatória aguda ocorre de uma maneira bifásica: a primeira consiste em eventos vasculares, tais como vasodilatação com aumento do fluxo sanguíneo local e aumento da permeabilidade vascular; e a segunda em eventos celulares, como migração de leucócitos para a zona lesada e produção de uma série de mediadores inflamatórios. Enquanto os eventos vasculares têm por finalidade maximizar o movimento de proteínas plasmáticas e células circulantes para fora da circulação e para dentro do local da infecção ou injúria, os eventos celulares têm como objetivo eliminar e/ou inativar os agentes agressores (tecidos necróticos, microrganismos e suas toxinas) (KUMAR et al., 2010).

Receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) são responsáveis pela detecção de microrganismos através do reconhecimento de estruturas conservadas entre várias espécies microbianas, os chamados padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), tais como o lipopolissacarídeo (LPS) presente na membrana externa de bactérias (CAVASSANI et al., 2008). Evidências recentes indicam que os PRRs também são responsáveis por reconhecer moléculas liberadas de células danificadas, denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs). Atualmente, 4 famílias diferentes de PRRs foram identificadas, incluindo os receptores tipo *Toll* (TLRs), receptores de lectina tipo C (CLRs), receptores tipo RIG I ácido retinoico induzível (RLRs) e os receptores tipo NOD (NLRs). Estes PRRs estão expressos não somente em macrófagos, como também em células dendríticas e em outras células imunes (ROCK e KONO, 2008; TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Uma vez que os TLRs se ligam aos PAMPs ou DAMPs, eles se associam a proteínas adaptadoras intracelulares as quais iniciam uma via de sinalização intracelular estimulando uma cascata de quinases e culminando na ativação do fator de transcrição denominado fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Este, por sua vez, controla a expressão de muitas moléculas necessárias ao processo inflamatório, incluindo citocinas pro-inflamatórias (por exemplo, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$ ), quimiocinas (por exemplo,

proteína inflamatória de macrófagos 1, proteína quimiotática de monócitos 1 e eotaxina) e moléculas de adesão vascular necessárias para o recrutamento de leucócitos – por exemplo, molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e E-selectina (ROCK e KONO, 2008; TAKEUCHI e AKIRA, 2010).

Quando um tecido sofre injúria ou invasão de microrganismos, os eventos vasculares se iniciam após o reconhecimento dos padrões moleculares por células imunes residentes no tecido, imediatamente após o dano, seguida da liberação por mastócitos, monócitos e plaquetas de aminas vasoativas, tais como serotonina e histamina, minutos após a lesão, e induzem vasodilatação local. O resultado é o aumento do fluxo sanguíneo, que é a causa do calor e vermelhidão (eritema) no local da inflamação. A vermelhidão está relacionada tanto a perda de fluido (ocasionada pelo aumento da permeabilidade vascular que se segue logo após a vasodilatação) quanto ao aumento do diâmetro do vaso, pois este processo leva à lentificação do fluxo sanguíneo e aumento da concentração de hemácias nas arteríolas e capilares que se movem lentamente numa condição denominada estase ou congestão vascular produzindo, então, vermelhidão localizada (CRUVINEL et al., 2010).

Em seguida à vasodilatação, ocorre aumento da permeabilidade vascular a qual pode ser causada por uma série de fatores, tais como: retração das células endoteliais (induzida por mediadores como histamina, bradicinina, substância P, óxido nítrico); injúria endotelial, que ocorre em casos de queimadura; injúria vascular mediada por leucócitos que está associada com estágios tardios da inflamação (KUMAR et al., 2010). Após o aumento da permeabilidade vascular, inicialmente saem do leito capilar líquido, eletrólitos e moléculas pequenas; e posteriormente, saem moléculas maiores como albumina e o fibrinogênio levando à formação de exsudatos no local da lesão. Estes eventos são a causa do edema (CRUVINEL et al., 2010; CALDER, 2015). Em seguida, o aumento da permeabilidade vascular também permite que células imunes, principalmente os leucócitos polimorfonucleares (neutrófilos) cruzem o endotélio em direção ao tecido infectado ou lesionado num evento conhecido como migração transendotelial ou diapedese (MULLER, 2003).

As etapas envolvidas no recrutamento de leucócitos são: 1) marginação, adesão transitória (rolamento) e adesão firme ao endotélio; 2) migração através do endotélio e da parede do vaso, processo denominado diapedese; e 3) migração nos tecidos em direção aos estímulos quimiotáticos. A marginação dos leucócitos ocorre devido à estase do fluxo sanguíneo e à redução do estresse de cisalhamento, permitindo que os

leucócitos assumam uma posição periférica ao longo da superfície endotelial. A adesão dos leucócitos às células endoteliais é mediada inicialmente pelas selectinas (tais como L-selectina, P-selectina e E-selectina) que garantem o rolamento das células imunes (adesão transitória) e, posteriormente, uma família de proteínas heterodiméricas de superfície chamadas integrinas, tais como a VCAM-1 e a ICAM-1 permitem a firme adesão dos leucócitos às células endoteliais. Durante a diapedese, o leucócito se contrai (de forma ameboide) entre as células endoteliais bem fechadas com mínima interrupção do revestimento vascular (MULLER, 2003; LEY et al., 2007; CALDER et al., 2009; KUMAR, 2013).

Após sair da circulação, os leucócitos emigram para os tecidos em direção ao local da injúria por quimiotaxia, processo definido como locomoção em direção a um gradiente químico. Substâncias exógenas (como produtos bacterianos, incluindo os peptídeos que possuem um aminoácido terminal N-formilmetionina e alguns lipídios) e endógenas como citocinas, particularmente aquelas da família de quimiocinas [por exemplo, a IL-8; componentes do sistema complemento (C5a); e metabólitos do ácido araquidônico (leucotrieno B4)], podem agir como quimioatraentes. Todos esses agentes quimiotáticos se ligam a receptores específicos ligados a proteínas G transmembrana na superfície dos leucócitos (KUMAR et al., 2010).

Estes leucócitos recém-chegados e ativados liberam mediadores químicos no local da inflamação que incluem os mediadores derivados de lipídios [por exemplo, prostaglandinas (PGs) e leucotrienos], endocanabinoides, fator de ativação plaquetária, mediadores peptídicos (citocinas e quimiocinas), EROs (por exemplo, ânion superóxido, peróxido de hidrogênio), derivados aminoacídicos (por exemplo, histamina, óxido nítrico) e enzimas (por exemplo, proteases de matriz). A liberação destes mediadores depende de fatores, como natureza do estímulo inflamatório, local anatômico envolvido, fase durante a resposta inflamatória e tipo celular envolvido (CALDER et al., 2009).

A ativação dos leucócitos resulta em reconhecimento e ligação da partícula a ser ingerida pelo leucócito, sua ingestão e morte ou degradação do material ingerido, eventos que são mediados pelas EROs, NO, mieloperoxidase e enzimas lisossômicas contidas nos grânulos dos leucócitos. As reações inflamatórias agudas podem ter um destes três resultados: 1) resolução completa, quando a injúria ou microrganismo é completamente eliminado e envolve a remoção dos restos celulares e microrganismos pelos macrófagos e reabsorção de fluido de edema pelos vasos linfáticos; 2) cura por

substituição de tecido conjuntivo (fibrose) que ocorre quando a injúria inflamatória alcança tecidos que são incapazes de se regenerar; 3) progressão da resposta aguda para inflamação crônica (FUJIWARA e KOBAYASHI, 2005; KUMAR et al., 2010). Além disso, células apoptóticas podem gerar mediadores, tais como interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento transformante (TGF- $\beta$ ) (ROCK e KONO, 2008) e os macrófagos “alternativamente ativados”, em resposta às citocinas IL-4 e IL-13, também produzem IL-10 e TGF- $\beta$  que vão limitar o processo inflamatório (KUMAR et al., 2010).

Os mediadores inflamatórios podem ser classificados de duas maneiras: do ponto de vista da origem e do ponto de vista bioquímico. Em relação à origem, podem ser divididos em duas classes: os derivados de células e os derivados das proteínas plasmáticas. Do ponto de vista bioquímico, podem ser divididos em: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008). A Tabela 1 apresenta as ações dos principais mediadores da inflamação.

**Tabela 1 – As ações dos principais mediadores do processo inflamatório. (Fonte: adaptado de KUMAR et al., 2010).**

Mediador	Principais Fontes	Ações
Histamina	Mastócitos, basófilos e plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, ativação endotelial
Serotonina	Plaquetas	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada
Prostaglandinas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, dor, febre
Leucotrienos	Mastócitos, leucócitos	Permeabilidade vascular aumentada, quimiotaxia, adesão e ativação de leucócitos
Fator ativador de plaquetas	Mastócitos, leucócitos	Vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, adesão de leucócitos, quimiotaxia, desgranulação, explosão oxidativa
Espécies reativas de oxigênio	Leucócitos	Destruição de microrganismos, injúria tecidual
Óxido Nítrico	Endotélio, macrófagos	Relaxamento do músculo liso vascular, destruição de microrganismos
Citocinas	Macrófagos, células endoteliais, mastócitos	Ativação endotelial local (expressão de moléculas de adesão), febre, dor, anorexia, hipotensão, resistência vascular diminuída (choque)
Quimiocinas	Leucócitos, macrófagos ativados	Quimiotaxia, ativação de leucócitos
Produtos do complemento (C5a, C3a, C4a)	Plasma (produzidos no fígado)	Quimiotaxia e ativação de leucócitos, vasodilatação (ativação de mastócitos)
Cininas	Plasma (produzidas no fígado)	Permeabilidade vascular aumentada, contração de músculo liso, vasodilatação, dor
Proteases ativadas durante a coagulação	Plasma (produzidas no fígado)	Ativação endotelial, recrutamento de leucócitos

Os mediadores derivados de células incluem as aminas vasoativas (histamina e serotonina), os metabólitos do ácido araquidônico (AA) (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), o fator ativador de plaquetas (PAF), EROs, NO, citocinas, quimiocinas, os constituintes lisossômicos dos neutrófilos e os neuropeptídios. Tais mediadores podem ser produzidos por leucócitos especializados (macrófagos residentes e mastócitos) ou por células presentes nos tecidos locais. Alguns mediadores (como histamina e serotonina) são pré-formados e estocados em grânulos intracelulares de mastócitos,

basófilos e plaquetas, e são rapidamente secretados por exocitose ou são sintetizados de novo (por exemplo, citocinas e prostaglandinas) (MEDZHITOV, 2008; KUMAR et al., 2010).

Os mediadores derivados de proteínas plasmáticas incluem as proteínas do complemento (C3a, C5a), o sistema da coagulação (fator XII) e as cininas (bradicinina e calicreína). Estes mediadores são produzidos principalmente no fígado como precursores inativos, e para serem ativados, necessitam ser submetidos a uma série de clivagens proteolíticas para exercer suas atividades biológicas (KUMAR et al., 2010).

A histamina e a serotonina são as duas principais aminas vasoativas que induzem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Ambas são armazenadas em moléculas pré-formadas nas células e, portanto, são os primeiros mediadores liberados durante o processo inflamatório. A histamina é encontrada em grânulos citoplasmáticos nos basófilos, mastócitos e plaquetas e seus efeitos vasoativos são mediados pela ligação a receptores tipo H<sub>1</sub> nas células endoteliais microvasculares. A serotonina também é um mediador vasoativo pré-formado e possui ações semelhantes às da histamina. É encontrada principalmente nas plaquetas. Sua liberação (assim como a da histamina) é estimulada quando as plaquetas se agregam no processo de coagulação. Assim, a reação de liberação de serotonina pelas plaquetas também produz permeabilidade vascular aumentada (KUMAR et al., 2010).

Os eicosanoides referem-se a uma família de metabólitos gerados enzimaticamente a partir de um ácido graxo poli-insaturado de 20 carbonos, o ácido araquidônico (AA) (Figura 3). O AA é um fosfolipídio de membrana liberado por ação das fosfolipases, principalmente a fosfolipase A<sub>2</sub> (WHITE, 1999). Os eicosanoides são sintetizados primariamente por 3 vias de oxigenação enzimática: as ciclo-oxigenases (COXs), as epoxigenases e as lipoxigenases (LOXs), sendo as primeiras as mais significantes do ponto de vista fisiológico. As COXs dão origem às PGs, à prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) e aos tromboxanos (TXs). Em mamíferos, duas principais isoformas de COX são reconhecidas: a COX-1, a qual é expressa constitutivamente e a COX-2, induzida nos locais de inflamação por monócitos e macrófagos e fatores de crescimento. Na via das LOXs, a 5-lipoxigenase é a enzima responsável pela formação dos leucotrienos (LTs) (FUNK, 2001).

Uma terceira isoforma da COX (COX-3) foi identificada em estudos mais recentes a qual possui atividades fisiologicamente diferentes de ambas as COX-1 e COX-2. Essa enzima parece ser altamente expressa no sistema nervoso central (SNC) e

pode ser encontrada também no coração e aorta; é seletivamente inibida por fármacos analgésicos e antipiréticos, como o paracetamol e a dipirona. Essa inibição representa o mecanismo primário central pelo qual esses fármacos inibem a dor e a febre (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). A identificação da COX-3 tem um efeito significativo no entendimento de mensageiros inflamatórios caracterizando novas rotas de formação dos prostanoides e na condução da dor (SCHWAB et al., 2003).

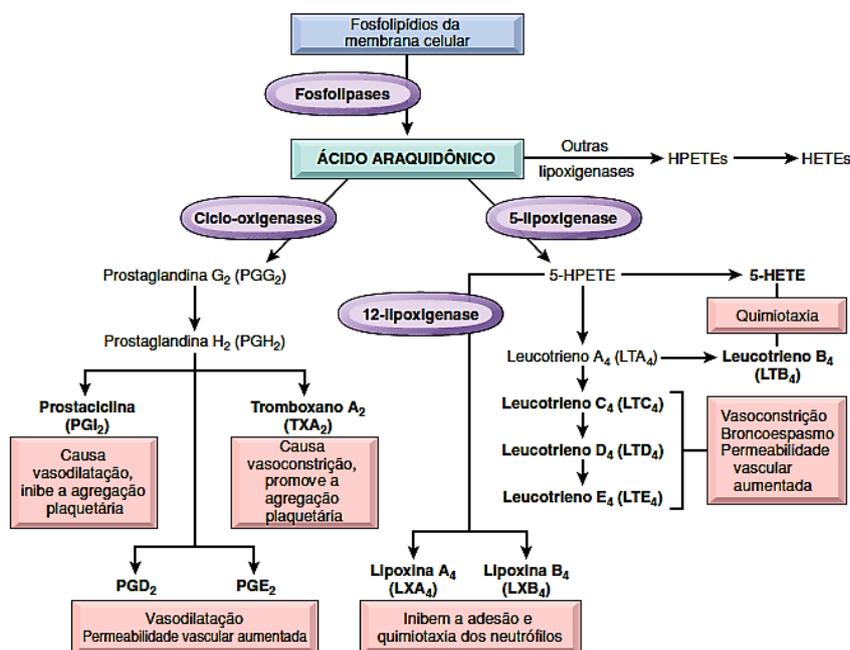


Figura 3 – Cascata do ácido araquidônico. (FONTE: Adaptado de KUMAR et al., 2010).

As principais PGs formadas durante o processo inflamatório são a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub> e o tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>). São produzidas por mastócitos, macrófagos, células endoteliais e muitos outros tipos de células. A PGE<sub>2</sub>, juntamente com a PGD<sub>2</sub>, causa vasodilatação e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares. A PGD<sub>2</sub> também é quimioatraente para neutrófilos. O TXA<sub>2</sub> é formado nas plaquetas, induz fortemente a agregação plaquetária e vasoconstrição. A PGI<sub>2</sub> induz vasodilatação, um potente inibidor da agregação plaquetária e também potencializa marcadamente o aumento na permeabilidade e efeitos quimiotáticos de outros mediadores (KUMAR et al., 2010).

Os LTs são sintetizados primariamente por células inflamatórias, como os leucócitos polimorfonucleares, macrófagos e mastócitos. O LTB<sub>4</sub> é um potente ativador de polimorfonucleares. *In vivo*, o LTB<sub>4</sub> estimula o rolamento, adesão ao endotélio

venular e transmigração endotelial dos neutrófilos em direção ao espaço extravascular através de integrinas específicas (NATHAN, 2002; KHANAPURE et al., 2007). Os leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>, LTE<sub>4</sub>) aumentam a permeabilidade vascular, causam intensa vasoconstrição e broncoespasmo (HENDERSON, 1994; KUMAR et al., 2010).

Citocinas são peptídeos liberados especialmente por muitos tipos de células, especialmente macrófagos e mastócitos, que agem nos sistemas imune e inflamatório, através de receptores específicos com a finalidade de alterar a atividade das próprias células que as produziram (ação autócrina) ou de outras células (ação parácrina e/ou endócrina). Incluem TNF, várias interleucinas (ILs), interferons e linfocinas e suas principais ações na resposta inflamatória são ativar o endotélio e leucócitos, bem como induzir uma resposta de fase aguda (MEDZHITOV, 2008). Há uma forte evidência de que citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 $\beta$ , IL-6, e TNF- $\alpha$  estejam envolvidas em processos de dor patológica (ZHANG e AN, 2007).

Embora as quimiocinas sejam consideradas citocinas, elas formam um grupo particular com propriedades funcionais e químicas específicas. Sua principal função é agir como substâncias quimioatraentes para macrófagos e leucócitos circulantes, fornecendo um estímulo chave no direcionamento dos leucócitos para o local da injúria e, por isso também são conhecidas como citocinas quimiotáticas. As principais quimiocinas são: IL-8, a proteína quimioatraente de macrófagos (MCP-1) e a eotaxina (VERRI e al., 2006).

### **2.2.2 Controle farmacológico da inflamação**

Embora o processo inflamatório seja indispensável à homeostase corporal, o desconforto causado pela resposta inflamatória exige, em alguns casos, a intervenção com o uso de medicamentos. Os glicocorticoides ou anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) os AINEs são fármacos capazes de interferir no processo inflamatório, minimizando os sinais cardinais da inflamação (rubor, tumor, dor, calor e perda de função).

Os glicocorticoides (tais como a dexametasona, prednisona e fludrocortisona) são esteroides lipofílicos caracterizados pela capacidade de se ligar ao receptor do cortisol e exercer efeitos semelhantes aos dele. Esta classe de medicamentos possui um amplo espectro de indicações terapêuticas, mas o tratamento envolvendo mecanismos de imunomodulação ou de inflamação é a sua principal indicação. No sistema imune, a

ação dos AIEs ocorre em diversos pontos, como na modulação da taxa de expressão de NF- $\kappa$ B inibindo a produção de COX-2 e, portanto, das PGs; ou quando inibem a fosfolipase A<sub>2</sub> inibindo a formação de todos os metabólitos do AA (FERREIRA et al., 2009).

Os AINEs (por exemplo: ácido acetilsalicílico, indometacina e ibuprofeno) representam um grupo heterogêneo de compostos, em sua maior parte consistem de anéis aromáticos ligados a um grupamento ácido funcional, com ação analgésica, antitérmica e anti-inflamatória. São ácidos orgânicos fracos que atuam principalmente nos tecidos inflamados e se ligam, significativamente, à albumina plasmática. Após a administração oral, sua absorção é rápida e completa (exceto as preparações entéricas e de liberação prolongada). Não atravessam a barreira hematoencefálica e são metabolizados principalmente pelo fígado. De modo geral, os AINEs são convertidos em metabólitos inativos e são, predominantemente, excretados na urina (BRENOL et al., 2000; ARDOIN e SUNDY, 2006; OLIVEIRA JÚNIOR et al., 2007).

Os AINEs derivados do ácido salicílico têm a meia-vida ampliada com o aumento da concentração plasmática do fármaco (SCHELGER, 1987; CLEMENTS e PAULUS, 1997). Os AINEs mais lipossolúveis, como cetoprofeno, ibuprofeno, penetram no SNC mais facilmente e estão associados com leve alterações no humor e na função cognitiva.

O principal mecanismo de ação dos AINEs consiste na inibição das COXs, com consequente diminuição da conversão do AA em PGs e combate à inflamação, dor e febre (KUMAR et al., 2010).

Estes medicamentos têm ação eficaz sobre a inflamação, no entanto o uso prolongado destes fármacos pode acarretar o aparecimento de efeitos colaterais que chegam a impossibilitar alguns tratamentos. Na corticoterapia, os efeitos estão relacionados ao tempo de tratamento e uso de AIEs de ação mais prolongada. São implicações em uma variedade de sistemas no organismo; no sistema endócrino-metabólico, imunológico, cardiovascular e muitos outros. Os efeitos colaterais causados pelo uso de AINEs não seletivos mais frequentes é a ulcerogênese. Uma vez que COX-1 é uma enzima constitutiva, importante na proteção da mucosa gástrica, sua inibição pode causar aumento da secreção ácida e, portanto, o uso crônico destes medicamentos pode acarretar em esofagite, gastrite ou duodenite, úlcera gástrica ou duodenal (WEIER, 2002; KHANAPURE et al., 2007). Além disso, os AINEs não seletivos também alteram a função renal através de seus efeitos nas PGs renais, pois, em geral, a COX-1 é

importante no controle da hemodinâmica renal e da taxa de filtração glomerular. As principais síndromes renais causadas pelo uso de AINEs não seletivos são: retenção de sódio causada quando ocorre bloqueio na produção de PGE<sub>2</sub>, com consequente edema periférico, aumento da pressão arterial, ganho de peso e insuficiência cardíaca congestiva (raramente); e hipercalcemia e falência renal aguda ocorrem quando a produção de PGI<sub>2</sub> é reduzida (WEIER, 2002).

Na tentativa de aumentar a aceitação dessas medicações pelos pacientes, reduzir a toxicidade (principalmente a gastrointestinal) e aumentar o efeito anti-inflamatório dos AINEs, foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2, a enzima induzível em eventos inflamatórios, tais como meloxicam, nimesulida, celecoxibe, que ficaram conhecidos como coxibes (BRENOL et al., 2000). Esse grupo de fármacos não apresenta o grupo carboxílico presente na maioria dos AINEs, e, por esse motivo, têm a capacidade de orientar-se seletivamente em direção à COX-2. Apresentam baixa hidrossolubilidade, o que dificulta sua administração parenteral (CRAIG e STITZEL, 2005). Embora, a princípio, o desenvolvimento dos inibidores seletivos da COX-2 tenha sido considerado promissor, estudos clínicos apontaram uma ocorrência elevada de eventos cardiovasculares e trombóticos em usuários crônicos destes fármacos (SARAIVA, 2007).

Tais eventos resultam de um desequilíbrio entre TXA<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>. No aparelho cardiovascular, a COX-1, presente nas plaquetas e nas células endoteliais vasculares, é responsável pela produção de TXA<sub>2</sub> o qual promove o aumento da adesão e agregação plaquetária, resultando em potencial efeito pró-trombótico. Enquanto isso, a formação de PGI<sub>2</sub>, através da COX-2, promove efeito contrário, através da redução da adesão e agregação de plaquetas. Dessa maneira, estes sistemas enzimáticos mantêm um equilíbrio entre os processos hemorrágicos e a trombose. Tais alterações da fisiologia da cascata do ácido araquidônico em usuário de inibidores seletivos da COX-2 explicam o aumento na ocorrência de eventos cardiovasculares (FITZGERALD, 2003; SARAIVA, 2007).

A principal abordagem terapêutica atual para o tratamento dos distúrbios inflamatórios baseia-se na administração destes fármacos, porém as inúmeras preocupações a respeito de sua segurança, torna esta prática desafiadora e continua a impulsionar a procura por novas alternativas terapêuticas.

## 2.3 Dor e Nociceção

A dor é um mecanismo fisiológico importante por possuir uma função protetora e permitir a sobrevivência dos indivíduos, uma vez que este sintoma permite a consciência de que sua integridade está sendo ameaçada ou que ocorre alguma alteração no organismo (FERREIRA et al., 2009). No entanto, devido às graves consequências que pode trazer consigo, tais como, estresse, sofrimento, comprometimento nas relações socioeconômicas (LOESER e MELZACK, 1999), a dor deve ser rápida e efetivamente controlada e tratada adequadamente.

Segundo Fein (2011), a palavra “dor”, na língua portuguesa, vem do latim “*dolor*” que significa sofrimento, e, na língua inglesa, a palavra “*pain*” vem do grego “*poinē*” e significa pena.

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor - IASP (IASP, 2017) como “uma experiência sensorial e/ou emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tais danos”. Esta definição leva em consideração a subjetividade do fenômeno doloroso e permite o entendimento de conceitos importantes sobre este assunto (ALMEIDA; ROIZENBLATT e TUFIK, 2004).

A definição mais recente de dor foi proposta por Williams e Craig (2016): “Dor é uma experiência angustiante associada a um dano tecidual real ou potencial com componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais”. Os autores sugeriram três razões para modificar uma definição amplamente utilizada. Primeira, a definição da IASP exclui características clinicamente importantes, em particular, os componentes cognitivos e sociais. Estes componentes são frequentemente considerados como sendo característicos da dor crônica, e podem ser negligenciados no entendimento da dor aguda, apesar de muitas evidências contrárias. Segunda, o termo “desagradável” potencialmente banaliza a dor severa, uma vez que as dores agudas ou crônicas mais problemáticas clinicamente são mais que uma sensação “desagradável”. Terceira, no conceito da IASP, a subjetividade e o autorrelato são priorizados à custa dos comportamentos não-verbais, fontes proeminentes de informações sobre dor em humanos e cobaias, especialmente aqueles cuja experiência subjetiva da dor não pode ser manifesta verbalmente.

Segundo Williams e Craig (2016), a definição proposta pela IASP descreve efetivamente a subjetividade essencial da dor, diferenciando-a dos processos

fisiológicos e facilita a apreciação da natureza multidimensional da dor. Desse modo, o conceito da IASP é parcial em vez de completo, omitindo qualidades essenciais necessárias para promover uma boa ciência e cuidados de saúde ótimos, e, portanto, incluir dimensões cognitivas e sociais no conceito de dor fornece uma perspectiva equilibrada e mais abrangente.

Dois componentes estão envolvidos no conceito de dor, a nocicepção e a percepção. A nocicepção, ou sensação nociceptiva, consiste nos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo externo, ou seja, nocicepção é o componente fisiológico da dor. Segundo a IASP (2017), a “nocicepção é o processo neural de decodificação de um estímulo nocivo”. A percepção está relacionada aos aspectos subjetivos e pode ser modulada pela emoção, motivação, condição psicológica e história de vida de cada indivíduo (MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001).

Uma vez que o termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, sem levar em consideração o componente emocional – ou seja, engloba as vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos capazes de detectar o estímulo nocivo (LAPA et al., 2007) –, é importante distinguir os conceitos de dor e nocicepção. Os animais não são capazes de expressar verbalmente a ocorrência de dor, e, portanto, neles não se avalia dor, e sim nocicepção, pois esta pode ser quantificada experimentalmente através dos comportamentos exibidos pelos animais frente a um estímulo nocivo. Logo, termos como dor e analgesia devem ser empregados para estudos em humanos, enquanto nocicepção e antinocicepção devem ser utilizados em estudos pré-clínicos envolvendo animais de laboratório.

### **2.3.1 Classificação de dor**

A dor pode ser classificada de diversas maneiras. Segundo a SBED (Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor) (2017), considerando a duração de sua manifestação, a dor pode ser aguda, crônica ou recorrente.

Dor aguda é aquela que se manifesta transitoriamente durante um período relativamente curto, de minutos a algumas semanas, associada a lesões em tecidos ou órgãos, ocasionadas por inflamação, infecção, traumatismo ou outras causas (SBED, 2017). Este tipo de dor normalmente desaparece quando o diagnóstico da causa subjacente é feito de maneira correta e quando o tratamento recomendado pelo

especialista é seguido corretamente pelo paciente (BRASIL, 2001; SBED, 2017). A dor aguda apresenta um valor biológico fundamental, pois constitui um alerta para a possibilidade de uma injúria tecidual ter ocorrido, além de induzir reações de defesa, fuga ou remoção do agente etiológico (TEIXEIRA, 2009). Neste tipo de dor, o paciente relata forte intensidade ou incapacitante de alto impacto na qualidade de vida. À dor aguda estão associados sinais de hiperatividade do sistema nervoso autônomo simpático, tais como taquicardia, taquipneia, aumento da pressão arterial, agitação psicomotora e ansiedade (BRASIL, 2001). Exemplos de dor aguda: cólicas do período menstrual, dor pós-cirúrgica.

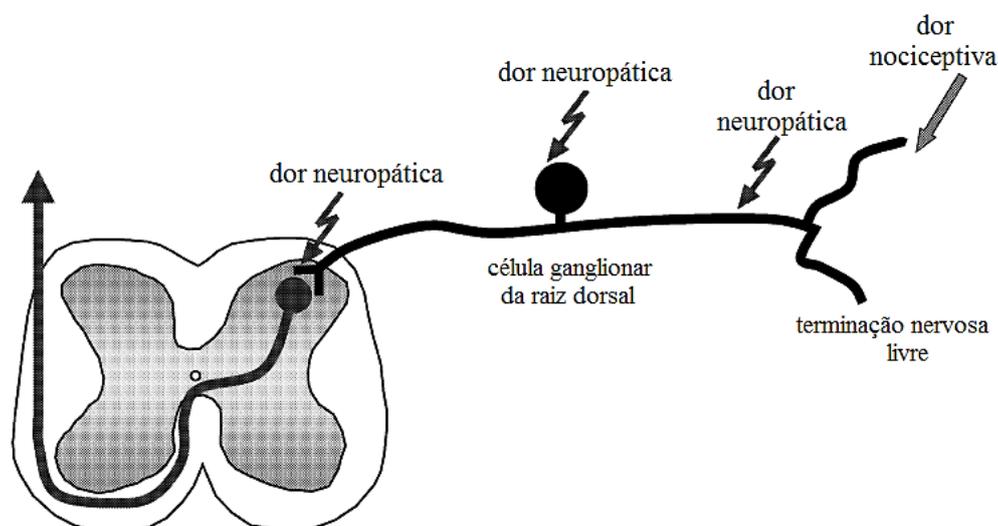
A dor crônica tem duração prolongada, podendo se estender de vários meses a anos. Está quase sempre associada a um processo de doença crônica, a exemplo da artrite reumatoide, e pode ser consequente de uma lesão já prévia e, em alguns casos, incorretamente tratada (SBED, 2017). Diferentemente da dor aguda, a dor crônica permite uma adaptação às respostas neurovegetativas simpáticas comuns na dor aguda, porém com respostas emocionais e de ansiedade frequentes (BRASIL, 2001). O valor biológico fundamental inerente à dor aguda não está presente na dor crônica, pois esta é constituída especialmente de reações musculoesqueléticas psicocomportamentais que induzem incapacidade e repercussões biopsicossociais desfavoráveis (CLAPHAM, 2003). Este tipo de dor, quando presente, tem seu grupo de sintomas, paradoxalmente, já que a dor é considerada um sintoma; comporta-se como uma doença em si, – porém taxá-la como tal ainda é discutível – causando além de sofrimento, grande queda na qualidade de vida. Imobilidade, depressão, alterações do sono, problemas nutricionais, dependência de medicamentos, de profissionais da saúde, de cuidadores e de instituições, incapacidade para o trabalho, ansiedade, medo, amargura, frustração, depressão e suicídio são algumas das complicações que podem acompanhá-la (SIQUEIRA, 2017).

Ao contrário que se pode pensar, a dor crônica não é apenas o prolongamento da dor aguda. Estimulações nociceptivas repetidas levam a uma variedade de modificações no SNC (BRASIL, 2001). As mudanças cerebrais em pacientes que sofrem a dor crônica têm sido motivo de inúmeras pesquisas. Estudos de neuroimagem mostraram mudanças morfológicas em algumas áreas do córtex cerebral e revisões científicas amplas mostram a extensão do problema com mudanças físicas, funcionais e genéticas no cérebro de quem sofre dor persistente. Talvez, a complexidade dessas amplas

alterações neuroplásticas sinalizem para a somatória de inúmeros fatores, adaptativos, de sobrevivência, e disfuncionais (SIQUEIRA, 2017).

A exemplo da enxaqueca, a dor recorrente manifesta-se em períodos de curta duração, porém que se repetem com frequência, podendo ocorrer durante toda vida do indivíduo, mesmo sem estar necessariamente associada a um processo específico (SBED, 2017).

De acordo com o mecanismo fisiopatológico, a dor é classificada em basicamente dois tipos: dor nociceptiva e dor neuropática (IASP, 2017) (Figura 4). A primeira refere-se à dor que surge de danos reais em tecidos não-neuronais (IASP, 2017) e é desencadeada por estimulação excessiva de nociceptores localizados em várias partes do corpo, como pele, vísceras e outros órgãos (MILLAN, 1999; IASP, 2010). Dor neuropática é aquela causada por uma lesão ou disfunção do sistema nervoso somatossensorial (IASP, 2017). Este tipo de dor pode ser sentido como uma queimação ou sensação de formigamento e inclui algumas síndromes, tais como: neuropatia diabética, dor do membro fantasma, distrofia simpática reflexa e causalgia (KATZ e ROTHENBERG, 2005).



**Figura 4 – A estimulação nociva do nociceptor nas terminações nervosas sensoriais causa dor nociceptiva, a estimulação patológica do axônio, do gânglio da raiz dorsal ou de neurônios no SNC causa dor neuropática (Fonte: adaptado de SCHAIBLE e RICHTER, 2004).**

Woolf, em seu artigo publicado no *The Journal of Clinical Investigation*, em 2010, discrimina três tipos diferentes de dor de acordo com a origem do estímulo: nociceptiva, patológica e inflamatória.

Dor nociceptiva é uma dor de alto limiar, decorrente da ativação fisiológica das vias nociceptivas; é um sistema de proteção fisiológica de alerta precoce, essencial para

perceber e minimizar o contato com estímulos nocivos (térmicos ou mecânicos) (WOOLF, 2010). Este tipo de dor é tipicamente agudo e latejante (KATZ e ROTHENBERG, 2005). Alguns exemplos de dor nociceptiva são: queimadura, fratura óssea.

Dor patológica é resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso e não confere caráter protetor, sendo, portanto, mal adaptativa. Este tipo de dor não é um sintoma de algum distúrbio, mas sim um estado de doença do sistema nervoso, que pode ocorrer após danos ao sistema nervoso (dor neuropática), e também em condições em que não há tal dano ou inflamação (dor disfuncional), como por exemplo, a fibromialgia (WOOLF, 2010).

Embora a IASP reconheça apenas dois tipos de dor, Woolf (2010) descreve, ainda, um terceiro tipo: a dor inflamatória, que também tem caráter adaptativo e protetor, uma vez que auxilia na cura do local lesionado por impedir o contato físico e o movimento. Este tipo de dor é decorrente da formação de mediadores hiperalgésicos inflamatórios – após ativação do sistema imune pós-injúria tecidual ou inflamação aguda – que provocam hipersensibilização dos nociceptores. Esta hipersensibilidade faz com que estímulos normalmente inócuos, agora provoquem dor (FERREIRA et al., 2009; WOOLF, 2010).

### **2.3.2 Fisiopatologia da dor**

Conhecer as vias neuroanatômicas envolvidas nos processos de recepção, transmissão, modulação e processamento da dor é um aspecto de fundamental importância, pois impulsiona a busca por fármacos analgésicos mais eficazes e potentes, e permite a aplicação clínica dos resultados experimentais obtidos em laboratórios de Farmacologia.

Os mecanismos de propagação dos estímulos nocivos são mediados por três estruturas básicas: nociceptores, medula espinal e cérebro (KATZ e ROTHENBERG, 2005). De maneira geral, pode-se considerar que a neurofisiologia da dor se apresenta de maneira quadrifásica: transdução, que ocorre pela ativação dos nociceptores, os quais transformam um estímulo nocivo em potencial de ação; transmissão, conjunto de eventos que permitem que o impulso nervoso gerado no nociceptor seja conduzido pelas fibras aferentes primárias A $\delta$  ou C, e informado para o SNC; modulação, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou facilitação da dor (PORTO, 2004); e, por último, a percepção, fase em que ocorre a integração das informações recebidas pelo

SNC e na qual o indivíduo se torna consciente quanto à localização, duração e intensidade do estímulo nocivo.

O processo de transdução do estímulo nocivo se inicia com a ativação dos nociceptores, receptores fisiológicos que permeiam os órgãos (pele, vasos sanguíneos e vísceras) e correspondem às terminações nervosas livres dos neurônios sensoriais primários. Estes neurônios de primeira ordem consistem em fibras nervosas de pequeno diâmetro, mielinizadas ou não, do tipo A $\delta$  ou C, cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (KATZ e ROTHENBERG, 2005).

As fibras aferentes primárias podem ser classificadas em termos de estrutura, diâmetro e velocidade de condução do impulso nervoso. As fibras do tipo C são amielinizadas, possuem de 0,4 a 1,2  $\mu\text{m}$  de diâmetro (pequeno calibre) e conduzem o potencial de ação em velocidades menores que 1m/s. As fibras A $\delta$  são finamente mielinizadas, com diâmetros entre 2,0 e 6,0  $\mu\text{m}$  (calibre intermediário) e apresentam velocidade de condução de 5 a 40 m/s. Fibras A $\beta$  são mielinizadas, com diâmetros maiores que 10  $\mu\text{m}$  (grosso calibre) e conduzem o impulso nervoso em velocidades entre 30 e 100 m/s; estas fibras, entretanto, não propagam estímulos nocivos em situações normais (MILLAN, 1999; BASBAUM e JESSEL, 2014).

Em relação aos nociceptores, são descritas três principais e distintas classes: mecânicos, térmicos, polimodais, apresentadas na Tabela 2.

**Tabela 2 – Classes de nociceptores. (Fonte: BASBAUM e JESSELL, 2014).**

<b>Tipo de Nociceptor</b>	<b>Características</b>
<b>Mecânico</b>	Respondem à pressão intensa e estão presentes em fibras A $\delta$ de médio diâmetro, pouco mielinizadas, que conduzem os potenciais de ação na velocidade de 5 a 40m/s.
<b>Térmico</b>	São ativados por temperaturas extremas, quentes (>45°C) e frias (<5°C) e também estão presentes em fibras A $\delta$ de médio calibre finamente mielinizadas e de condução rápida (5 a 40m/s).
<b>Polimodal</b>	Respondem a estímulos de alta intensidade, mecânicos, térmicos e químicos e estão presentes em fibras do tipo C de pequeno calibre e não mielinizadas, as quais conduzem lentamente os impulsos (<1m/s).

Segundo Millan (1999), estas classes estão amplamente distribuídas na pele e nos tecidos profundos e são frequentemente coativadas. Enquanto as fibras A $\delta$  propagam informações modalmente específicas, com marcada intensidade e curta latência, as fibras C propagam informação de maneira lenta e, às vezes, secundária à

ação das fibras A $\delta$ . Enquanto aquelas promovem uma rápida sensação de primeira dor ou dor aguda, disparando reflexos de retirada, estas têm potenciais prolongados que sofrem somação temporal e induzem manifestações de dor difusa. Embora amplamente utilizada, esta diferenciação não pode ser aplicada a todos os órgãos, sendo mais evidente na pele (ALMEIDA; ROIZENBLATT e TUFIK, 2004). Exemplificando a informação supracitada, quando um martelo bate no polegar de um indivíduo, ele sente inicialmente uma dor aguda e intensa – “primeira dor” – a qual é transmitida pelas fibras do tipo A $\delta$  que carregam as informações tanto dos nociceptores mecânicos quanto térmicos. Em seguida, o indivíduo sente uma dor menos intensa, porém mais prolongada e às vezes, ardente, a “segunda dor”, transmitida pelas fibras do tipo C as quais levam informações dos nociceptores polimodais (BASBAUM e JESSEL, 2014).

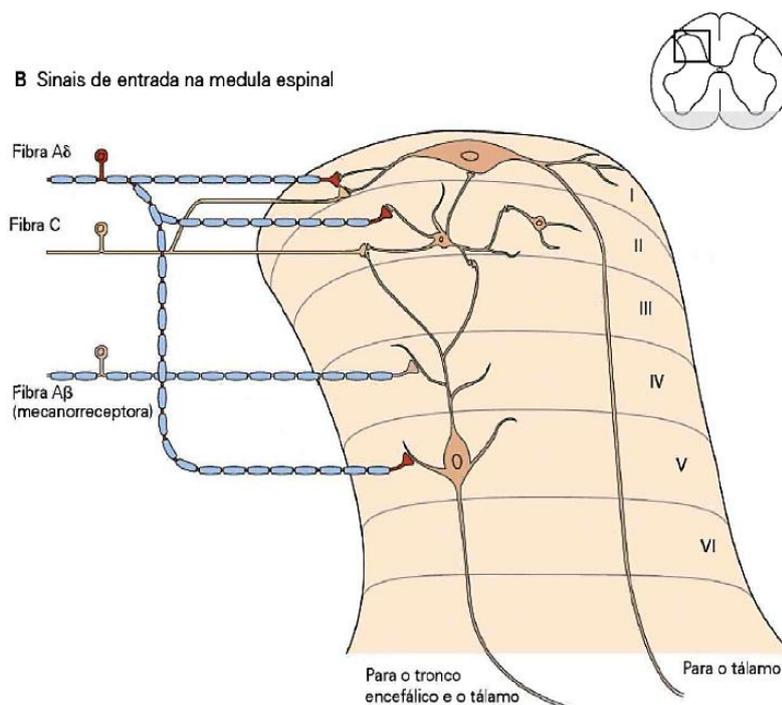
As fibras A $\delta$  são classificadas em dois grupos: tipo I que apresentam mecanorreceptores de alto limiar e respondem primariamente a estímulos mecânicos de alta intensidade e fracamente a estímulos térmicos ou químicos e após serem ativadas, também podem ser responsivas a altas temperaturas; tipo II que possuem receptores mecano-térmicos para altas temperaturas (acima de 45 °C), alguns receptores para frio intenso (abaixo de 5 °C) e que, depois de ativados, são sensíveis a estímulos mecânicos de limiares inócuos (MILLAN, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT e TUFIK, 2004).

As fibras C apresentam receptores termossensíveis ao calor e ao frio, mecanorreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias algógenas, tais como íons potássio (K<sup>+</sup>), acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandina, substância P e histamina. Muitas fibras C com receptores de alto limiar são sensíveis a estímulos mecânicos ou térmicos ou químicos, e por esta razão são chamadas polimodais. Um tipo específico de fibra C responde a alta intensidade térmica e, em associação com as fibras polimodais, parecem ser responsáveis por conduzir o estímulo após dano tecidual. Outro tipo de fibra C de condução lenta, insensível a estímulos mecânicos e sensível à histamina também é reconhecida e provavelmente está envolvida na sensação de queimação (MILLAN, 1999; ALMEIDA; ROIZENBLATT e TUFIK, 2004).

A ativação dos nociceptores, em resposta a estímulos nocivos, gera uma corrente de despolarização que se propaga ao longo de toda a fibra e é conduzida até o SNC (WOOLF; SALTER, 2000). A membrana destas fibras nas terminações nervosas livres possui receptores que convertem a energia térmica, mecânica ou química em potencial elétrico despolarizante e, quando a amplitude do potencial sensor é suficientemente alta,

potenciais de ação são disparados e conduzidos pelo axônio até o corno dorsal da medula espinal (BASBAUM e JESSEL, 2014).

As fibras nociceptivas possuem elevado limiar de ativação, e se projetam da periferia para o corno dorsal da medula espinal (mais precisamente nas lâminas de Rexed I e II) onde ativam um grande número de neurônios de segunda ordem que podem ser interneurônios ou neurônios de projeção (Figura 5) (BASBAUM e JESSEL, 2014; SCHAIBLE e RICHTER, 2004; CURY et al., 2011).

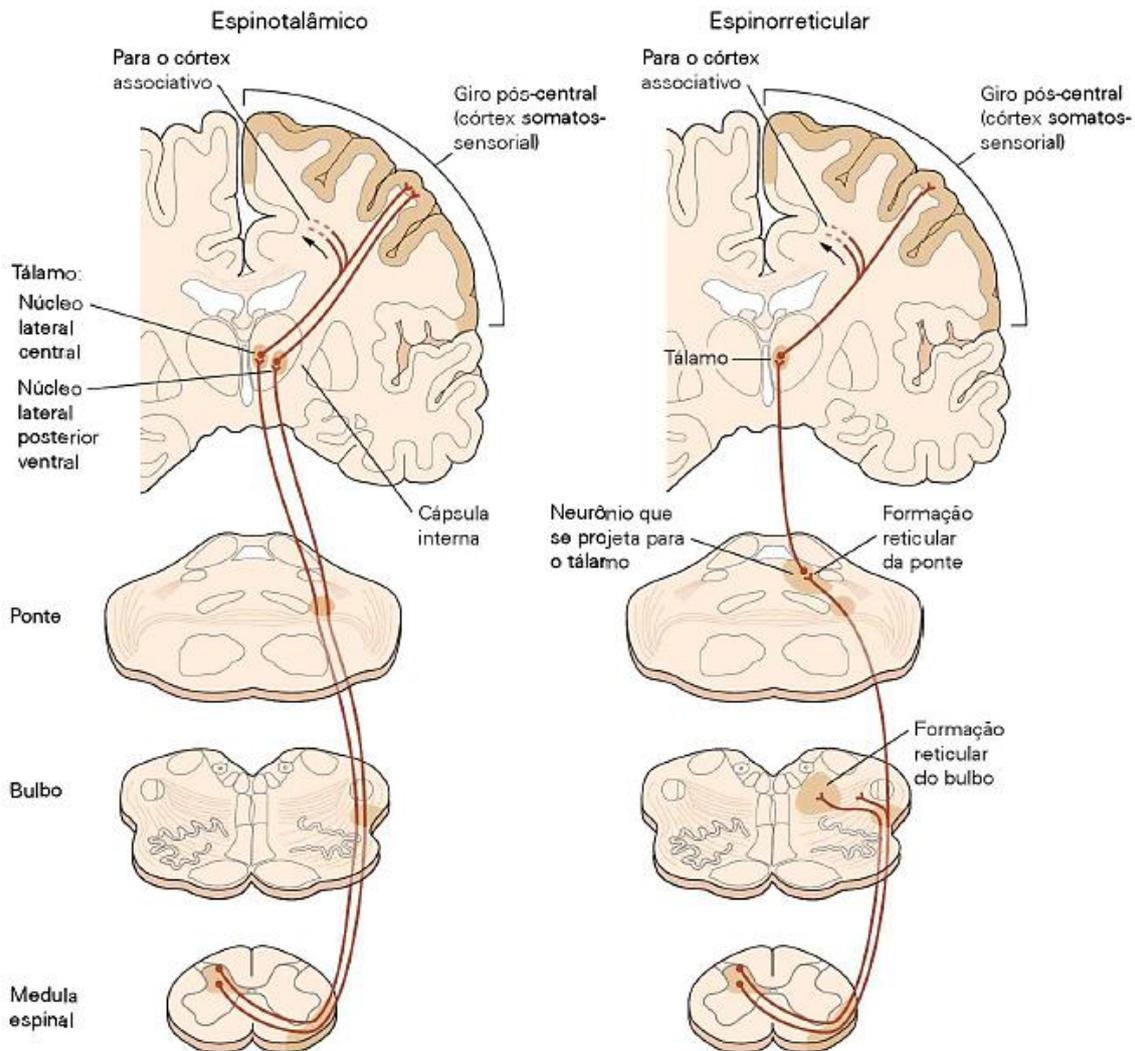


**Figura 5 – As fibras nociceptivas terminam no corno dorsal da medula espinal. (Fonte: BASBAUM e JESSEL, 2014).**

No corno dorsal da medula espinal, primeiro local de sinapse na via nociceptiva, estas fibras nervosas sensoriais primárias liberam neurotransmissores, tais como: glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, capazes de ativar os neurônios de projeção (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

Ainda na medula, os axônios de neurônios espinhais de segunda ordem, cruzam a linha média, e a informação dolorosa, na forma de potencial de ação ascende através de diferentes tratos nervosos específicos – principalmente os tratos espinotalâmico e trato espinoreticular – até a convergência com populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo. Essa informação neural se projeta, então, do tálamo para córtex somatossensorial, região onde ocorre a percepção da dor pelo indivíduo e as várias submodalidades, como qualidade, intensidade, localização e duração são

integrados na experiência da percepção (CURY et al., 2011). As duas principais vias ascendentes que transmitem a informação nociceptiva da medula espinal aos centros superiores podem ser visualizadas na Figura 6.



**Figura 6 – As duas principais vias de ascendência da informação nociceptiva da medula espinal ao córtex somatossensorial. (Fonte: Adaptado de: BASBAUM e JESSEL, 2014).**

O corno dorsal da medula espinal está sujeito a mecanismos locais e descendentes de modulação da dor. A modulação da dor é um processo fisiológico que ocorre no SNC e envolve a liberação de peptídeos opioides, tais como encefalinas e dinorfinas, aminas biogênicas e outros transmissores. O sistema endógeno de modulação da dor consiste de interneurônios presentes no corno dorsal da medula e dos tratos neurais descendentes que inibem o sinal de transmissão da dor (CURY et al., 2011).

No corno dorsal da medula espinal, os neurônios de projeção sofrem influência de uma interação entre as fibras aferentes nociceptivas ( $A\delta$  e C) e as fibras não nociceptivas ( $A\alpha$  e  $A\beta$ ) que podem desencadear uma analgesia localizada (MILLAN, 2002). Exemplificando, uma leve massagem na região lesada ativa as fibras não nociceptivas que, por sua vez, ativam um interneurônio que inibe a transmissão do impulso nervoso das fibras nociceptivas. Esse fenômeno ficou conhecido sob o nome de “teoria do controle do portão”, descrito pela primeira vez por Melzak e Wall, em 1960.

Os neurônios de projeção também sofrem influência de tratos descendentes que reduzem ou facilitam o processo nociceptivo. A inibição descendente é formada por vias que originam os núcleos do tronco encefálico (em particular, substância cinzenta periaquedutal e núcleo magno da rafe) e descendem no funículo dorsolateral da medula espinal (MILLAN, 2002; SCHAIBLE e RICHTER, 2004; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004). Um estímulo nocivo é capaz de ativar o mecanismo descendente de inibição da dor. Ao ser ativado, fibras noradrenérgicas e serotoninérgicas favorecem a liberação de encefalinas e endorfinas nos cornos posteriores da medula espinal e a liberação de peptídeos opioides endógenos nestes locais inibe a percepção da dor de forma difusa (WILLER, BOUHASSIRA e LE BARS, 1999; MILLAN, 2002). Os mecanismos inibitórios da transmissão do estímulo nocivo que ocorrem a nível medular e supraespinal constituem o sistema analgésico endógeno (MILLAN, 2002).

### **2.3.3 Dor inflamatória**

A interação entre o tecido danificado e os nociceptores por mediadores formados durante o processo inflamatório produz dor inflamatória. Diferentes mediadores, tais como endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpáticas provocam o aumento da sensibilidade neuronal a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor (VERRI et al., 2006).

Em 1982, a IASP redefiniu a sensibilização dos nociceptores em duas categorias: alodinia e hiperalgesia. Alodinia é uma resposta dolorosa a um estímulo inócuo, ou seja, que normalmente não produz dor, enquanto hiperalgesia é uma resposta dolorosa aumentada a um estímulo nocivo (IASP, 2017).

Os mediadores inflamatórios produzidos durante a resposta imune inata podem ser divididos em dois grupos: os mediadores hiperalgésicos intermediários e os mediadores hiperalgésicos finais. Estes incluem as aminas simpáticas (adrenalina, noradrenalina e dopamina) e as PGs (principalmente  $PGE_2$ ), as quais são liberadas em

resposta à ação dos mediadores intermediários. As PGs interagem com receptores presentes nas membranas dos neurônios sensoriais nociceptivos primários, ativando-os e levando à redução do limiar de ativação e aumento da sensibilidade neuronal. Estas modificações facilitam a ação de estímulos anteriormente inócuos ou pouco eficazes em produzir dor (Figura 7). Os mediadores intermediários mais importantes no processo de dor inflamatória são as citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1) e quimiocinas (IL-8) (FERREIRA et al., 2009).

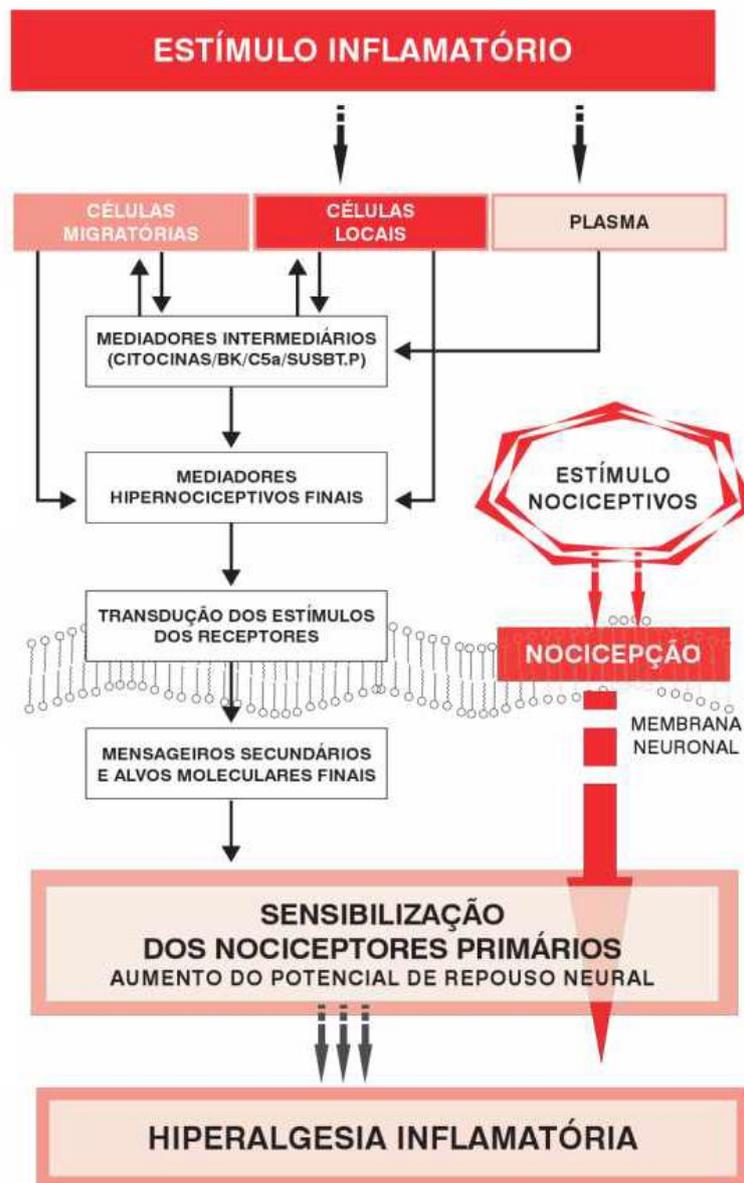


Figura 7 – Mecanismos da dor inflamatória. (Fonte: adaptado de FERREIRA et al., 2009).

O TNF- $\alpha$  é a primeira citocina liberada durante o processo inflamatório. Após sua liberação, ela induz a liberação de IL-1 $\beta$  pelas células presentes e conseqüentemente de PGs, elementos importantes na produção de hiperalgesia. As endotelinas têm

importante papel na gênese da dor inflamatória em processos isquêmicos e em doenças cardiovasculares. A substância P é considerada um modulador da transmissão nociceptiva que atua principalmente na medula espinal, controlando o fluxo de informações transmitidas pelos neurônios primários aos centrais. Com relação ao sistema nervoso periférico, existem evidências de que ela pode ser liberada durante o processo inflamatório, principalmente pelas terminações nervosas livres dos tecidos inflamados, contribuindo para o aparecimento do processo denominado inflamação neurogênica e atuando de maneira autócrina nessas terminações, sensibilizando-as (FERREIRA et al., 2009).

A bradicinina induz sensibilização do nociceptor direta e indiretamente. O efeito indireto é dependente da produção de mediadores de ação direta, tais como as PGs e as aminas simpáticas, que sensibilizam os nociceptores (CUNHA et al., 2007). Tais mediadores agem preferencialmente nos receptores metabotrópicos da membrana neuronal das fibras C e dos nociceptores silenciosos e são responsáveis por reduzir o limiar do nociceptor e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal, gerando sensibilização central e facilitando a liberação de neuropeptídeos relacionados à dor (VERRI et al., 2006; RAHBARDAR et al., 2017).

#### **2.3.4 Opioides**

Opioides são um grupo de fármacos, naturais ou sintéticos, e referem-se de maneira ampla a todos os compostos de estrutura semelhante à morfina presente no ópio. São os fármacos mais utilizados e eficazes no tratamento de dor aguda e crônica. O termo *opium* deriva da palavra grega *opos*, que significa suco, pois a substância ativa está presente no suco da papoula (*Papaver somniferum*) (IASP, 2010; YARKSH e WALLACE, 2012).

Em 1806, Friedrich Sertürner, descreveu o isolamento por cristalização de uma substância pura no ópio e a denominou morfina, em referência a Morfeu, o deus grego dos sonhos. A morfina é considerada o agonista opioide clássico, pois ela é capaz de estimular todos os receptores opioides (YARKSH e WALLACE, 2012).

Os opioides podem ser divididos em quatro classes: os naturais, da qual fazem parte a morfina e a codeína, conhecidos como opioides alcaloides e de ocorrência natural no ópio; os semissintéticos, como a heroína e oxicodona; os totalmente sintéticos, como a metadona (MAZAK et al., 2009); e os endógenos, como as endorfinas, dinorfinas e encefalinas, os peptídeos opioides endógenos, ligantes naturais

que ativam receptores opioides durante estresse, eventos inflamatórios, câncer (COSTANTINO et al., 2012).

Nos mamíferos, os três tipos de peptídeos opioides, endorfinas, encefalinas e dinorfinas, são sintetizados via clivagem de proteínas precursoras (COSTANTINO et al., 2012). As endorfinas derivam da clivagem da proteína precursora proopiomelanocortina e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  opioides. As encefalinas derivam da proteína precursora proencefalina e possuem afinidade pelos receptores  $\mu$  e  $\delta$  opioides. As dinorfinas, por sua vez, derivam da clivagem da prodinorfina e exibem afinidade pelos receptores opioides  $\kappa$  (FENG et al., 2012; YARKSH e WALLACE, 2012).

Os opioides exercem seus efeitos através de sua ligação a receptores opioides presentes na membrana celular dos neurônios. Esses receptores foram descobertos pela primeira vez em áreas específicas do cérebro relacionadas à dor, como o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, núcleos da rafe, *locus coeruleus*, nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinal e nos neurônios sensoriais primários e por este motivo, os opioides produzem analgesia potente quando administrados sistemicamente, por via espinal ou periférica (IASP, 2010).

Estão descritos três principais tipos de receptores na farmacologia dos opioides:  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$ , confirmados por clonagem subsequente (YARKSH e WALLACE, 2012) e membros de uma larga família de receptores acoplados à proteína  $G_i$ . Após a ligação do opioide ao receptor, ocorrem mudanças conformacionais em sua estrutura que permitem o acoplamento da proteína  $G_i$  à porção C-terminal dos receptores opioides. Na subunidade  $G\alpha$ , GDP é substituído por GTP e ocorre uma dissociação do complexo trimérico proteico em subunidades  $G\alpha$  e  $G\beta\gamma$ . A dissociação entre as subunidades inicia uma cascata de eventos intracelulares que medeiam o efeito antinociceptivo de opioides em neurônios aferentes primários. Os principais eventos intracelulares que ocorrem após a dissociação das subunidades da proteína G são: a) inibição da atividade da adenilil ciclase e conseqüentemente da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPC); b) redução da abertura dos canais de  $Ca^{2+}$  controlados por voltagem; c) hiperpolarização através da estimulação da corrente de  $K^+$  por vários canais, inclusive os canais de  $K^+$  retificadores internos ativados pelas proteínas G; e d) ativação da proteína quinase C (PKC) e da fosfolipase C (PLC) (STEIN et al., 2009; YARKSH e WALLACE, 2012).

Algumas ações dos receptores opioides estão bem definidas de acordo com o subtipo e sua localização no sistema nervoso. Os receptores  $\delta$  estão localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos, e são responsáveis principalmente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência física. Cabem aos receptores  $\kappa$  as funções de nocicepção, termorregulação, controle de diurese e secreção neuroendócrina; estão localizados no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa na medula espinal e em neurônios sensitivos periféricos. Quanto aos receptores  $\mu$ , estão localizados no córtex cerebral, tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrointestinal; estes regulam funções como a nocicepção, o ciclo respiratório e o trânsito intestinal (MARTINS et al., 2012).

Além de modulação da dor e da dependência, os receptores opioides são amplamente envolvidos em várias atividades fisiológicas e fisiopatológicas, incluindo a modulação da dor, homeostase iônica, proliferação celular, resposta emocional, função imune, alimentação, obesidade, controles respiratório, gastrointestinal e cardiovascular, bem como algumas desordens neurodegenerativas (FENG et al., 2012).

### **2.3.5 Controle farmacológico da dor**

O controle farmacológico da dor envolve basicamente duas estratégias. A primeira consiste no uso de drogas que bloqueiam diretamente o mecanismo de condução da dor, resultando em antinocicepção; essas drogas são representadas pelos opioides, como morfina, codeína, fentanil e tramadol as quais abolem diretamente a transmissão nociceptiva pela ligação aos receptores opioides (HOSKIN e HANKS, 1991). A segunda estratégia envolve o uso de drogas que inibem a sensibilização dos nociceptores e, portanto, o desenvolvimento de hipernocicepção; este é o principal mecanismo de ação das drogas que inibem as ciclo-oxigenases, os AINEs (CASHMAN, 1996). Entre os principais AINEs utilizados no tratamento da dor estão o ácido acetilsalicílico, ibuprofeno e indometacina.

Apesar da gama relativamente grande de opções para o tratamento da dor, alguns estados de dor como os de origem neuropática, são muito refratários a analgésicos, e apenas 1/3 dos pacientes referem analgesia superior a 50% (SINDRUP e JENSEN, 1999). Por isso, o controle da dor ainda depende do desenvolvimento de fármacos mais

eficazes, com efeitos adversos mínimos e com indicação para modalidades de dor ainda de difícil tratamento (JULIUS e BASBAUM, 2001).

A despeito de seus efeitos analgésicos eficazes e potentes, o uso de opioides é limitado, pois está associado a uma incidência de 50-80% de efeitos adversos a longo prazo. Estes variam de boca seca, constipação, depressão respiratória e distúrbios do sono a tolerância, dependência e sedação (ARORA; CAO; JAVAHERI, 2014; THOMSON; RAIT; MILLER, 2016), e, portanto, o uso de fármacos opioides no tratamento da dor deve ser devidamente avaliado.

Como a maioria dos AINEs produzidos e comercializados inibem tanto a COX-1 (enzima expressa de maneira constitutiva e envolvida na citoproteção epitelial gástrica e hemostasia) quanto a COX-2 (enzima induzida durante eventos de inflamação) (GROSSER; SMYTH; FITZGERALD, 2012) estes fármacos, assim como os opioides, também causam efeitos colaterais graves, tais como alta toxicidade renal e gastrointestinal que podem resultar em grande morbidade, limitando seu uso prolongado (HENRY et al., 1996).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Avaliar as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos em metanol da *Annona tomentosa* e suas partições.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos em metanol da *Annona tomentosa* e suas partições sob condições de nocicepção aguda, através dos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de retirada da cauda;
- Avaliar o envolvimento dos sistemas opioide, nitrérgico, colinérgico e dos canais de  $K^+$  sensíveis ao ATP na ação das partições do extrato em metanol da *Annona tomentosa* no modelo de retirada da cauda;
- Avaliar a atividade antiedematogênica dos extratos em metanol da *Annona tomentosa* no modelo de edema de pata induzido por carragenina, histamina e serotonina;
- Avaliar a migração de leucócitos e quantificar as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  a partir do modelo de bolsa de ar subcutânea;
- Avaliar a atividade dos extratos em metanol da *Annona tomentosa* sobre a atividade locomotora espontânea no modelo do campo aberto.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Coleta da Planta

A coleta das folhas e cascas do caule da *Annona tomentosa* R.E.Fr (Annonaceae) foi realizada pela doutoranda Ina Gomes da Silva e Marcos Bispo, em São Luís, Maranhão, Brasil (2° 33' 9" S, 44° 18' 13" W), em março de 2013. A planta foi classificada por Ana Maria Maciel e uma exsicata foi depositada no Herbário Rosa Mochel, na Universidade Estadual do Maranhão, sob o número 3773.

### 4.2 Preparo e Partição dos Extratos em Metanol

As folhas e as cascas do caule coletadas foram secas ao ar livre, em local ventilado e ao abrigo do sol, pelo período de uma semana e, em seguida, levadas à estufa a 45 °C por 24 horas.

As cascas do caule (163 g) foram extraídas por maceração exaustiva em metanol (CH<sub>3</sub>OH) à temperatura ambiente. A periodicidade de troca de solvente foi, em média, de 72 horas. O solvente foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida, finalizando a concentração sob corrente de aeração contínua para gerar o extrato bruto (ATCM; 36,02 g) e o material foi estocado a -20 °C até o uso.

As folhas (1,5 kg) da *Annona tomentosa* foram extraídas por maceração em metanol à temperatura ambiente e o solvente foi removido por destilação a vácuo para gerar o extrato bruto (ATFM, 48 g) correspondente a aproximadamente 6% (w/w). O material foi estocado a - 20 °C até o uso. O extrato ATFM foi dissolvido em metanol/água (3:7) e a solução foi submetida a partição líquido-líquido com extrações sucessivas em hexano (*n*-C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), acetato de etila (EtOAc) e butanol (BuOH), produzindo, após a destilação dos solventes, ATFM-H (partição em hexano; 2,27 g), ATFM-D (partição em diclorometano; 1,08 g), ATFM-Ac (partição em acetato de etila; 3,79 g) e ATFM-Bu (partição em butanol; 11,45 g). Os extratos foram produzidos pela doutoranda Ina Gomes da Silva e foram fornecidos pelo Laboratório de Química de Produtos Naturais, da UFRRJ, liderado pelo professor Dr. Mário Geraldo de Carvalho.

### 4.3 Animais

Camundongos *Swiss*, machos, pesando entre 20 e 22 g, foram obtidos do nosso Biotério Central. Os animais foram mantidos em condições de temperatura controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), 12 h de ciclo claro/escuro, com livre acesso à água e ração. Doze horas antes dos experimentos, os animais receberam apenas água para eliminar a possibilidade de interferência da ração sobre o processo de absorção dos extratos. Os protocolos experimentais de utilização de animais deste estudo foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais, do Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (CEUA/ICBS – UFRRJ), sob o nº 9383/2016-80.

### 4.4 Fármacos, Drogas e Reagentes

Foram utilizadas as seguintes substâncias: ácido acético (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil), dexametasona (pureza - 97%), N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (pureza - 98%), cloridrato de naltrindol (pureza > 98%), dicloridrato de norbinaltorfimina (pureza > 98%), glibenclamida (pureza > 99%), atropina (pureza > 99%), ácido acetilsalicílico (pureza - 99%),  $\lambda$ -carragenina, histamina (pureza - 99%), serotonina (pureza - 98%) e dimetilsulfóxido (pureza - 99,9%) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), naloxona (pureza - 97%) e morfina (pureza - 97%) (Cristália, São Paulo, Brazil).

### 4.5 Tratamentos e Preparo das Substâncias

- Controle: grupo tratado com água destilada;
- Veículo: grupo tratado com solução de dimetilsulfóxido (DMSO) em água destilada na concentração de 2,5% (v/v). O DMSO é o solvente utilizado na diluição dos extratos. Este grupo foi incluído a fim de descartar a interferência deste solvente nos efeitos antinociceptivo e/ou anti-inflamatório.
- ATCM: extrato bruto em metanol do caule da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;

- ATFM: extrato bruto em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral, na dose de 100 mg/kg no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;
- ATFM-H: partição em hexano do extrato bruto em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral nos modelos de contorções abdominais (10, 50 e 100 mg/kg), de retirada da cauda (10, 50 e 100 mg/kg) e do edema de pata (100 mg/kg);
- ATFM-D: partição em diclorometano do extrato bruto em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral nos modelos de contorções abdominais (100 mg/kg), do edema de pata induzido por carragenina (100 mg/kg) e histamina e serotonina (10, 50 e 100 mg/kg) e bolsa de ar subcutânea (10, 50 e 100 mg/kg);
- ATFM-Ac: partição em acetato de etila do extrato bruto em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg nos modelos de contorções abdominais e do edema de pata;
- ATFM-Bu: partição em n-butanol do extrato bruto em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Administrado por via oral na dose de 100 mg/kg nos modelos de contorções abdominais e do edema de pata;
- Ácido acético: utilizado para induzir as contorções abdominais no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e preparado na concentração de 1,2% (v/v) em água destilada e administrado 0,01 mL/g de peso do animal da solução por via intraperitoneal 60 minutos após a administração oral dos extratos da *Annona tomentosa*, veículo e morfina;
- Carragenina: agente flogógeno utilizado nos modelos de edema de pata e bolsa de ar subcutânea, preparada a 1% (10 mg/mL). Administrada no volume de 0,1 mL na bolsa de ar subcutânea estéril e 0,02 mL por via intraplantar na pata traseira direita no modelo de edema de pata e 60 minutos após a administração oral de água destilada, veículo e dos extratos e administração subcutânea de dexametasona;
- Serotonina: utilizada para induzir edema no modelo do edema de pata. Administrada no volume de 0,02 mL por via intraplantar na pata traseira (100 µg/pata) direita e 60 minutos após a administração oral de água destilada, ou veículo e dos extratos e administração subcutânea de dexametasona;
- Histamina: utilizada para induzir edema no modelo do edema de pata. Administrada no volume de 0,02 mL por via intraplantar na pata traseira direita no modelo de edema de pata (100 nmol/pata) e 60 minutos após a administração oral de água destilada, ou veículo e dos extratos e administração subcutânea de dexametasona;

- Dexametasona: anti-inflamatório esteroide reconhecido e utilizado como controle positivo nos modelos do edema de pata e bolsa de ar subcutânea estéril. Foi administrado na dose de 2,25 mg/kg, por via subcutânea. Esta dose utilizada foi obtida a partir do cálculo de ED<sub>50</sub> (dose que produz 50% do efeito máximo de uma droga);
- Morfina: agonista não seletivo de receptores opioides reconhecidamente utilizado como analgésico. Neste estudo, foi utilizada como controle positivo nos modelos algésimétricos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e de retirada da cauda. Este fármaco foi administrado por via oral nas doses de 5,01 mg/kg no modelo de contorções abdominais e 8,15 mg/kg nos modelos de retirada da cauda e do campo aberto. As doses utilizadas foram obtidas a partir do cálculo de ED<sub>50</sub>;
- Naloxona: antagonista não seletivo de receptores opioides. Foi administrada por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 5 mg/kg;
- Naltrindol: antagonista seletivo de receptor opioide  $\delta$ . Foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 3 mg/kg;
- Nor-binaltorfimina: antagonista seletivo de receptor opioide  $\kappa$ . Foi administrada por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 3 mg/kg;
- L-NAME: inibidor não seletivo da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 3 mg/kg;
- Glibenclamida: bloqueador de canais de K<sup>+</sup> sensíveis ao ATP (K<sub>ATP</sub>). Foi administrada por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 5 mg/kg;
- Atropina: antagonista não seletivo de receptor para acetilcolina do tipo muscarínico. Foi administrado por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração de ATFM-H no modelo de retirada da cauda, na dose de 5 mg/kg.

Os extratos e partições foram testados nos modelos de nocicepção e inflamação em doses (10, 50 e 100 mg/kg) padronizadas pelo nosso laboratório.

Os valores de DE<sub>50</sub> dos fármacos de referência (morfina e dexametasona), utilizados como controle positivo para as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, foram obtidos ajustando-se os pontos de dados que representam os efeitos

antinociceptivo e/ou anti-inflamatório demonstrados nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de retirada da cauda, edema de pata e da bolsa de ar subcutânea estéril por regressão não-linear (dose resposta sigmoideal) utilizando o software GraphPad Prism, versão 6.0 (San Diego, Califórnia, USA).

#### 4.6 Modelos de Avaliação da Atividade Antinociceptiva

##### 4.6.1 Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Modelo utilizado para triagem da atividade antinociceptiva (KOSTER et al., 1959). Foi realizada a administração intraperitoneal de 0,01 mL/g de peso do animal de ácido acético (1,2%), 60 minutos após a administração água destilada, veículo, morfina, extratos e partições por via oral. A contagem das contorções foi iniciada imediatamente após a injeção do ácido acético e permaneceu durante 30 minutos. O padrão determinado para contagem das contorções abdominais foi o aparecimento de fortes contrações da parede abdominal seguida de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, e contato do abdômen com o assoalho do recipiente em que o animal se encontrava. A Figura 8 apresenta o protocolo experimental estabelecido para este modelo.

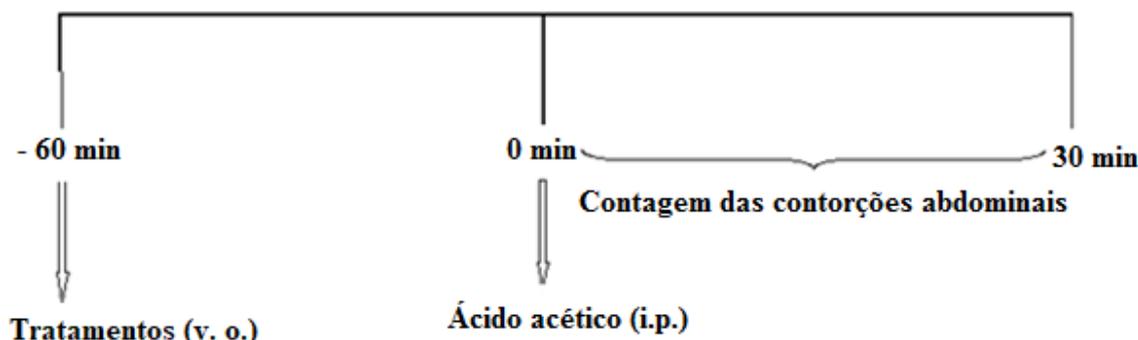
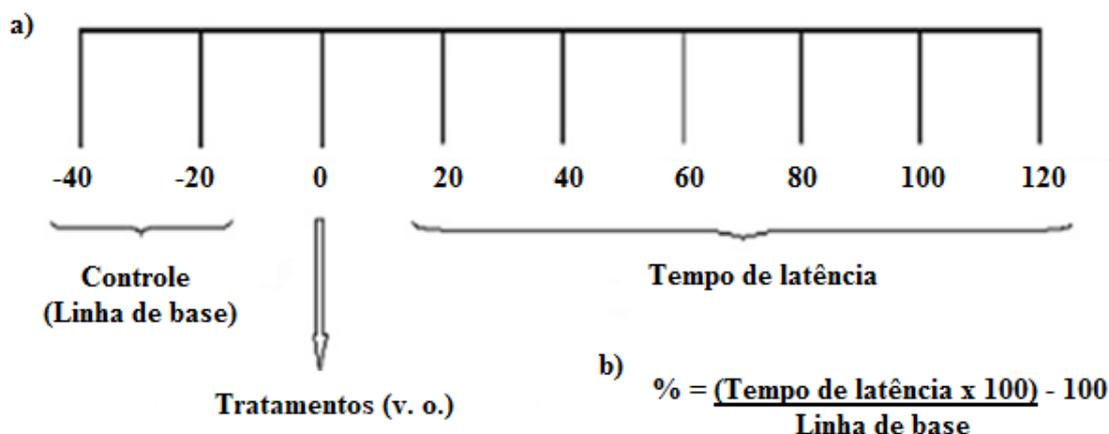


Figura 8 – Protocolo experimental do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

##### 4.6.2 Modelo de retirada da cauda

Este modelo foi utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva neurogênica, como previamente descrito (D'AMOUR; SMITH, 1941; MONCADA et al., 2003) utilizando-se um aparelho denominado “algesímetro tail flick”. Os animais foram mantidos em um tubo de acrílico e a cauda do animal foi posicionada sobre o aparelho e em seguida, um feixe de luz nocivo foi focado a aproximadamente 4 cm da ponta da cauda e a latência de retirada da cauda pelo animal foi registrada

automaticamente através do cronômetro eletrônico contido no equipamento. A intensidade da fonte de luz radiante foi ajustada para valores de linha de base entre 2 e 4 segundos; esta intensidade não foi alterada e os animais que apresentaram valores de linha de base fora destes limites foram excluídos do experimento. Foram feitas várias medidas dos tempos de latência com intervalos de 20 minutos entre cada uma delas, totalizando oito medidas. As duas primeiras medidas foram realizadas antes da administração de água destilada, veículo, morfina ou partições (ATFM-H e ATFM-D) (medidas controle). A média das medidas controle é denominada “linha de base”. Outras seis medidas foram feitas após a administração dos tratamentos, também com um intervalo de 20 minutos entre elas. Para se evitar danos teciduais causados pela temperatura na cauda dos animais, foi calculado um “cut-off” de 3 vezes o valor da linha de base. A antinocicepção foi quantificada pelo cálculo do percentual de aumento em relação à linha de base, dado pela fórmula representada na Figura 9b, a partir do protocolo experimental (Figura 9a).



**Figura 9 – Modelo de retirada da cauda. a) Protocolo experimental; b) Fórmula utilizada para a quantificação da antinocicepção.**

A fim de investigar o mecanismo de ação da partição em hexano foram administrados antagonistas e inibidores por via intraperitoneal 15 minutos antes da administração da partição ATFM-H. Naloxona (5 mg/kg), naltrindol (3 mg/kg), norbinaltorfimina (3 mg/kg), L-NAME (3 mg/kg), atropina (5 mg/kg) e glibenclamida (5 mg/kg) foram administrados com a finalidade de avaliar a participação dos sistemas opioide, nitrérgico, muscarínico e a participação dos canais  $K_{ATP}$ , respectivamente (TABARELLI et al., 2004; OTUKI et al., 2005; DOS SANTOS et al., 2015; GONÇALVES et al., 2016).

### 4.6.3 Modelo do campo aberto

Com o objetivo de avaliar a atividade dos extratos e das partições sobre a mobilidade espontânea dos animais, os camundongos foram submetidos ao modelo do campo aberto. O procedimento foi semelhante ao descrito por Barros e colaboradores (1991). Os animais foram manuseados por poucos minutos e treinados na arena em que foi realizado o experimento cinco dias antes do teste comportamental. Os animais foram colocados individualmente em uma câmara de observação 60 minutos após a administração oral de água destilada, veículo, morfina e partições (ATFM-H e ATFM-D). O assoalho da câmara é dividido em quadrados (5 x 5 cm) e a atividade locomotora espontânea dos animais foi quantificada pelo número de quadrados percorridos durante o intervalo de 5 minutos (Figura 10).

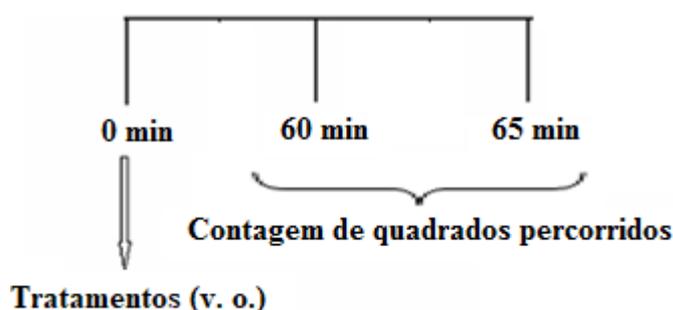


Figura 10 – Protocolo experimental do modelo de campo aberto.

## 4.7 Modelos de Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

### 4.7.1 Modelo do edema de pata

Para avaliar o efeito antiedematogênico do extrato em metanol da *Annona tomentosa* e suas partições, utilizou-se a técnica da pletismografia. Através do pletismômetro, foi avaliado o edema na pata dos animais induzido por carragenina (FERREIRA, 1979), e posteriormente por serotonina e histamina (PIRES et al., 2016). Este aparelho mede pequenas variações de volume de líquido, numa coluna de água acoplada ao equipamento, deslocado pela inserção da pata do animal até a articulação tíbio-társica. Diferentes grupos foram tratados oralmente com água destilada, veículo e partições (ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Ac e ATFM-Bu) por via oral (na dose de 100 mg/kg), e dexametasona (2,25 mg/kg) por via subcutânea, 60 minutos antes da indução do edema. O edema na pata dos camundongos foi induzido através da administração intraplantar de 0,02 mL de carragenina (1%), 0,02 mL de histamina (100  $\eta$ mol/pata) e 0,02 mL de serotonina (100  $\mu$ g/pata) na pata esquerda traseira do animal. Na pata direita

traseira foi injetado o mesmo volume de água destilada. O edema foi avaliado nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da carragenina, e nos tempos de 1 e 2 horas após a administração de histamina e serotonina, conforme demonstrado nos esquemas da Figura 11 e 12, respectivamente. Os resultados foram expressos pela diferença de volume entre as patas esquerda e direita traseiras, em  $\mu\text{L}$ .

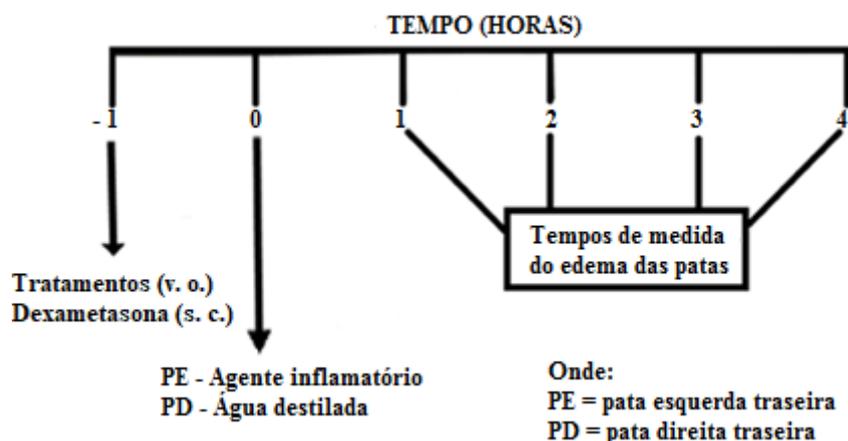


Figura 11 – Protocolo experimental do modelo de edema de pata induzido por carragenina.

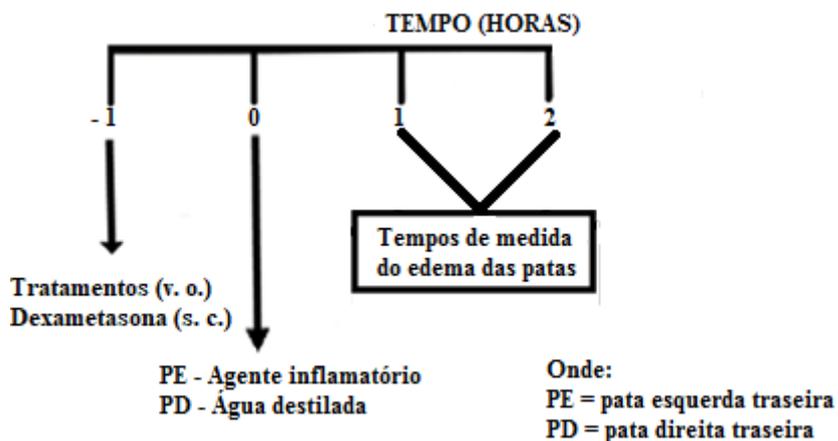


Figura 12 – Protocolo experimental do modelo de edema de pata induzido por histamina e serotonina.

#### 4.7.2 Modelo da bolsa de ar subcutânea estéril

A fim de analisar a produção de citocinas e migração de leucócitos, realizou-se este modelo conforme descrito por Vigil e colaboradores (2008). Para gerar as bolsas de ar subcutâneas, uma área da pele do dorso dos animais (3cm x 2,5 cm) foi desinfetada com iodóforo e em seguida, 7 mL de ar estéril foram injetados, via subcutânea, em um

único ponto, utilizando uma agulha de calibre 16 e uma seringa de 10 mL. No terceiro dia, as bolsas de ar foram novamente injetadas com ar estéril. Neste período, não foi observado o aparecimento de vermelhidão, inchaço, exsudação e vazamento de ar, sugerindo que o modelo foi estabelecido com sucesso. No quarto dia após a indução da bolha, diferentes grupos de animais foram tratados com água destilada, veículo e partição ATFM-D por via oral, e dexametasona (2,25 mg/kg), por via subcutânea, 60 minutos antes da administração de carragenina (1%) por via subcutânea, aplicada diretamente na bolha. Quatro horas após a injeção de carragenina, os animais foram eutanasiados com uma sobredose de pentobarbital e em seguida, foram fixados em uma mesa cirúrgica e uma incisão na pele dos animais foi feita para perfurar a bolsa de ar. A cavidade subcutânea foi lavada com 1 mL de tampão fosfato salina (PBS) estéril [pH 7,3 contendo Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (5 mM) e KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (1 mM) em água destilada]. Amostras simples de fluido foram coletadas da cavidade da bolsa de ar de cada camundongo e transferidas para um Eppendorf<sup>®</sup> a fim de determinar a migração de leucócitos e quantificar as citocinas presentes no lavado da bolsa. O esquema do protocolo experimental está demonstrado na Figura 13.

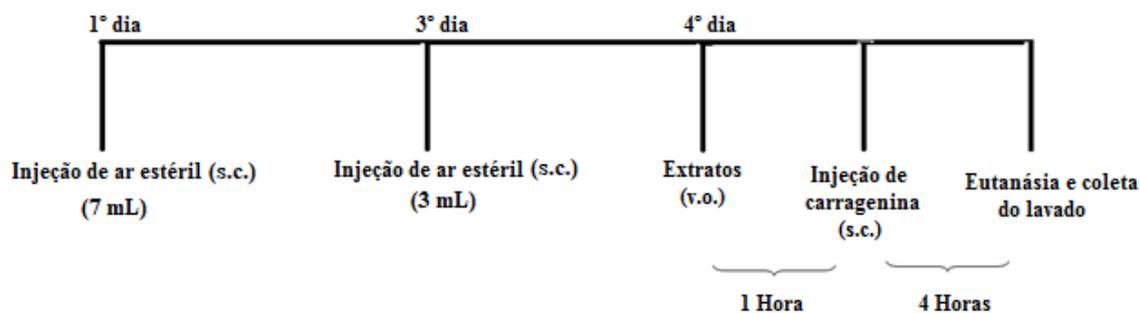


Figura 13 – Protocolo experimental do modelo da bolsa de ar subcutânea estéril.

#### 4.7.2.1 Contagem de células na cavidade de ar subcutânea estéril

Uma alíquota de 20µL do lavado subcutâneo, obtida a partir do modelo de bolsa de ar subcutânea estéril, de cada animal foi coletada e transferida para um Eppendorf<sup>®</sup> contendo 380µL de líquido de Türk (utilizado para coloração de leucócitos) e, em seguida, foi feita a contagem das células brancas em câmara de Neubauer, sob microscopia óptica.

#### **4.7.2.2 Quantificação de citocinas**

Os exsudatos da bolsa de ar subcutânea estéril foram centrifugados a 170 x g por 10 min a 4° C e os sobrenadantes foram transferidos para um Eppendorf®. Em seguida, procedeu-se à determinação da concentração das citocinas em alíquotas (50µL) do lavado subcutâneo. Foram utilizados kit's de imunensaio enzimático (Mouse IL-1β ELISA Kit Mouse, Immunoleader® e TNF-α ELISA Kit mouse, Cayman Chemical®), e a concentração das citocinas foi determinada através do método de ELISA, utilizando o protocolo fornecido pelos fabricantes, semelhante ao estudo de RAMANA e colaboradores (2007).

#### **4.8 Tratamento Estatístico**

Todos os grupos experimentais foram constituídos de 6-10 animais. Os resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (EPM). A significância estatística entre os grupos foi realizada pela aplicação de análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Bonferroni para os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, quantificação de leucócitos e citocinas, campo aberto e rota-rod e de ANOVA de duas vias acompanhada pelo teste de Bonferroni para os modelos de retirada da cauda e do edema de pata. Os valores de *p* menores que 0,05 (\*); 0,01 (\*\*) e 0,001 (\*\*\*) foram considerados estatisticamente significantes.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Modelos de Avaliação da Atividade Antinociceptiva

#### 5.1.1 Efeito dos extratos em metanol das folhas da *Annona tomentosa* e suas partições no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Inicialmente foram testados, neste modelo, os extratos em metanol brutos do caule e das folhas da *Annona tomentosa* (ATCM e ATFM, respectivamente, na dose de 100 mg/kg). Conforme a Figura 14, o extrato ATFM foi eficaz em inibir significativamente as contorções abdominais em, aproximadamente, 49% ( $27,8 \pm 4,4$  contorções). A administração intraperitoneal de ácido acético (1,2%) induziu uma média de  $54,2 \pm 6,1$  de contorções durante 30 minutos (grupo controle). A morfina (5,01 mg/kg) inibiu as contorções em, aproximadamente, 53% em comparação ao grupo controle ( $25,4 \pm 3,5$  contorções). Os dados que se referem à Figura 14 estão apresentados na Tabela 3.

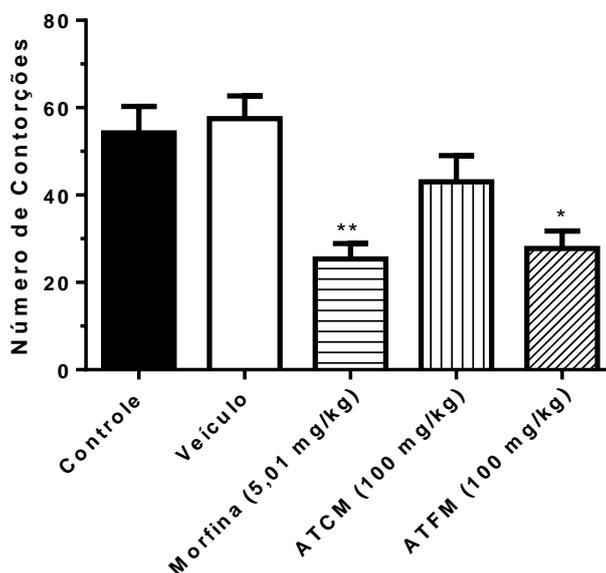


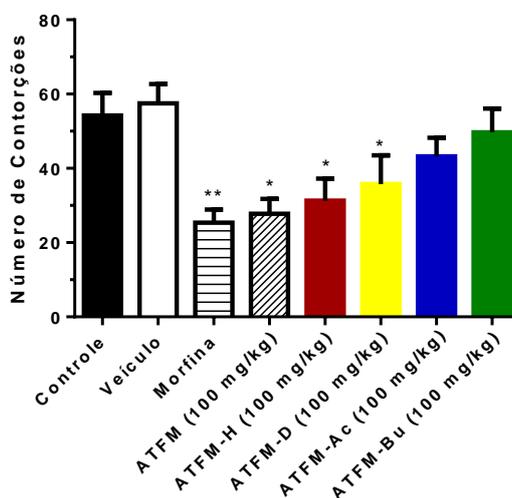
Figura 14 – Efeitos da administração oral prévia dos extratos em metanol das cascas do caule e das folhas da *Annona tomentosa* (ATCM e ATFM, respectivamente) na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ) do número de contorções. A significância estatística (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$ ) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina, ATCM e ATFM, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 3 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com ATCM e ATFM.**

Tratamentos	Número de contorções	Percentual de inibição
Controle	54,2 ± 6,1	-
Veículo	57,5 ± 5,2	-
Morfina	25,4 ± 3,5**	53,1%
ATCM (100 mg/kg)	43,4 ± 6,3	-
ATFM (100 mg/kg)	27,8 ± 4,4*	48,7%

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina, ATCM e ATFM, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Uma vez que o extrato em metanol bruto das folhas da *Annona tomentosa* (ATFM) teve efeito significativo em reduzir as contorções abdominais, avaliamos o efeito das partições deste extrato (ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Ac e ATFM-Bu) neste modelo. As partições em hexano e em diclorometano reduziram significativamente as contorções abdominais, conforme pode ser visualizado na Figura 15. As partições do ATFM, administradas na dose de 100 mg/kg, inibiram as contorções abdominais em aproximadamente 42% (31.3 ± 5.9 contorções), 34% (35.8 ± 7.7 contorções), 20% (43.2 ± 5.0 contorções) e 8% (49.7 ± 6.4 contorções), respectivamente (Tabela 4).



**Figura 15 – Efeitos da administração oral prévia das partições do extrato em metanol das folhas (ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Ac e ATFM-Bu) da *Annona tomentosa*, na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg), no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de contorções. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e**

os grupos tratados com veículo, morfina e as partições do ATFM, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 4 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com as diferentes partições do extrato em metanol das folhas da *Annona tomentosa*.

Tratamentos	Número de contorções	Percentual de inibição
Controle	54,2 ± 6,1	-
Veículo	57,5 ± 5,2	-
Morfina	25,4 ± 3,5**	53,1%
ATFM-H (100 mg/kg)	31,3 ± 5,9*	42,3%
ATFM-D (100 mg/kg)	35,8 ± 7,7*	34,0%
ATFM-Ac (100 mg/kg)	43,2 ± 5,0	-
ATFM-Bu (100 mg/kg)	49,7 ± 6,4	-

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e as partições do ATFM, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

Ainda no modelo de contorções abdominais, verificamos o efeito da partição ATFM-H em doses crescentes. Na Figura 16, podemos visualizar o efeito significativo da partição em hexano nas doses de 50 e 100 mg/kg, em 27,1% (39,5 ± 5,2) e em 42,3% (31,3 ± 5,9), respectivamente, efeito que, conforme a Tabela 5, apresentou-se de maneira dose-dependente.

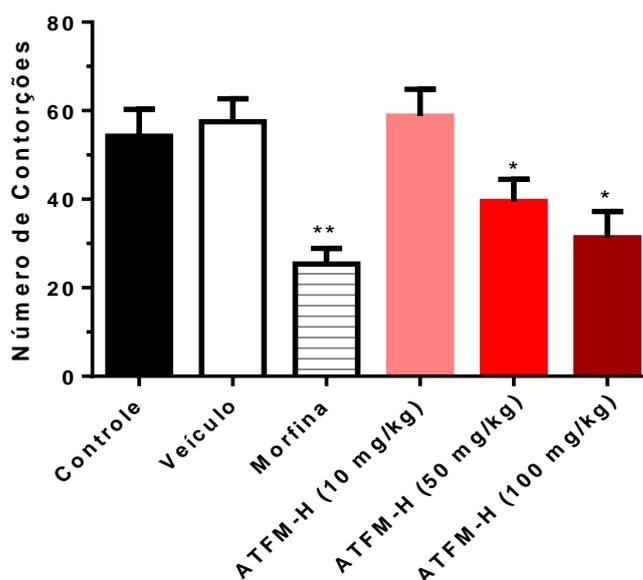


Figura 16 – Efeitos da administração oral prévia de diferentes doses do ATFM-H (10, 50 e 100 mg/kg), controle, veículo e morfina (5,01 mg/kg) no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de contorções. A

significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, morfina e a partição em hexano em doses crescentes, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 5 – Modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético com doses crescentes da partição em hexano do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa*.**

Tratamentos	Número de contorções	Percentual de inibição
Controle	54,2 ± 6,1	-
Veículo	57,5 ± 5,2	-
Morfina	25,4 ± 3,5**	53,1%
ATFM-H (10 mg/kg)	58,8 ± 6,6	-
ATFM-H (50 mg/kg)	39,5 ± 5,2*	27,1%
ATFM-H (100 mg/kg)	31,3 ± 5,9*	42,3%

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e ATFM em doses crescentes, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

### 5.1.2 Efeito das partições do extrato em metanol das folhas da *Annona tomentosa* no modelo de retirada da cauda

Conforme apresentado na Figura 17, a partição ATFM-H e a morfina apresentaram efeito significativo. O ATFM-H, na dose de 100 mg/kg, aumentou significativamente o tempo de latência da retirada da cauda nos tempos 40, 60 e 80 minutos após a administração da partição em hexano, enquanto que a partição em diclorometano não aumentou o tempo de latência em nenhum dos tempos avaliados (Tabela 6). O efeito do ATFM-H no modelo de retirada da cauda foi observado nas em todas as doses (10, 50 e 100 mg/kg) e em todos os tempos de medição da latência da retirada da cauda (Figura 18).

As Figuras 19A e 19B mostram os resultados da administração prévia de naloxona, glibenclamida, L-NAME, naltrindol, norbinaltorfimina e atropina juntamente com o tratamento, por via oral, com a partição ATFM-H para determinar o seu possível mecanismo de ação. A naloxona e o naltrindol reverteram significativamente o efeito antinociceptivo da partição em hexano (Tabela 8).

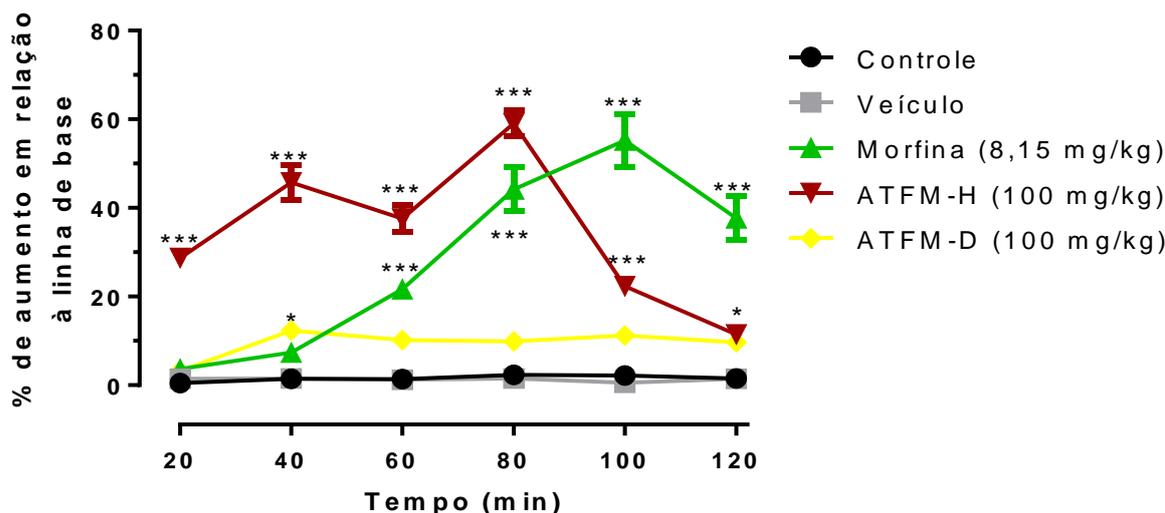


Figura 17 – Efeitos da administração oral prévia do ATFM-H e ATFM-D na dose de 100 mg/kg, controle, veículo e morfina (8,15 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina, ATFM-H e ATFM-D, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 6 – Efeito das partições ATFM-H e ATFM-D no modelo de retirada de cauda.

Tratamentos	Tempo de Latência (segundos)						
	Linha de Base	20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 $\pm$ 0,6	2,94 $\pm$ 0,9	3,25 $\pm$ 0,9	3,24 $\pm$ 0,6	2,95 $\pm$ 0,8	3,22 $\pm$ 0,6	3,44 $\pm$ 0,3
Veículo	2,95 $\pm$ 0,6	3,04 $\pm$ 1,1	3,05 $\pm$ 0,4	3,04 $\pm$ 0,7	3,05 $\pm$ 0,6	3,02 $\pm$ 0,9	3,04 $\pm$ 0,5
Morfina	2,89 $\pm$ 0,4	3,11 $\pm$ 0,6	3,52 $\pm$ 0,8	5,05 $\pm$ 0,7***	5,33 $\pm$ 0,8***	4,96 $\pm$ 0,2***	5,13 $\pm$ 0,8***
ATFM-H (100 mg/kg)	3,21 $\pm$ 0,8	4,13 $\pm$ 0,7	4,68 $\pm$ 0,6**	4,42 $\pm$ 0,2*	5,12 $\pm$ 0,2***	3,93 $\pm$ 0,4	3,58 $\pm$ 0,7
ATFM-D (100 mg/kg)	2,78 $\pm$ 0,6	2,87 $\pm$ 0,1	3,12 $\pm$ 0,5	3,06 $\pm$ 0,8	3,05 $\pm$ 0,4	3,09 $\pm$ 0,3	3,05 $\pm$ 0,5

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre os tempos de latência da linha de base e os tempos obtidos nas demais medidas em cada grupo, por Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

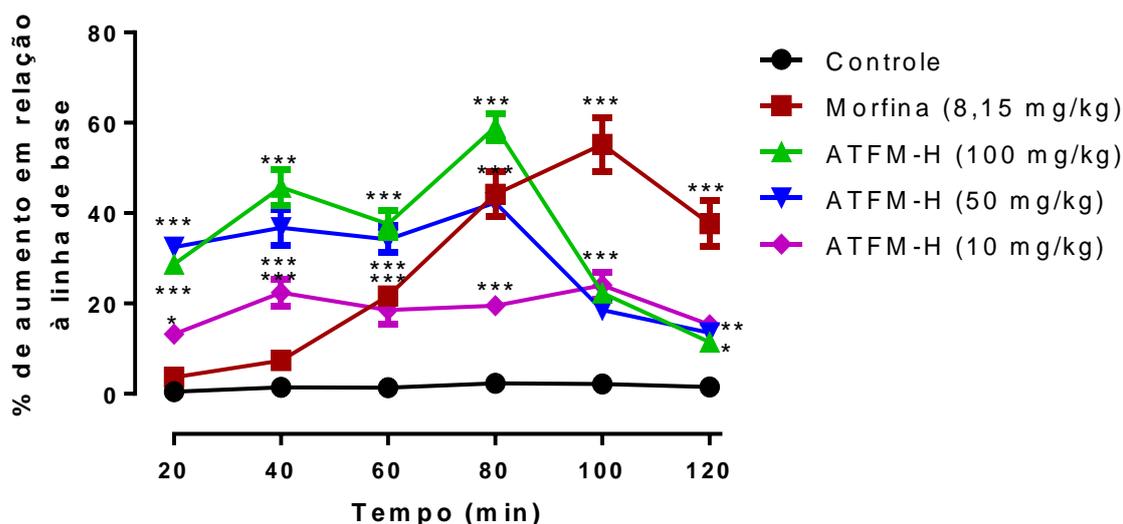
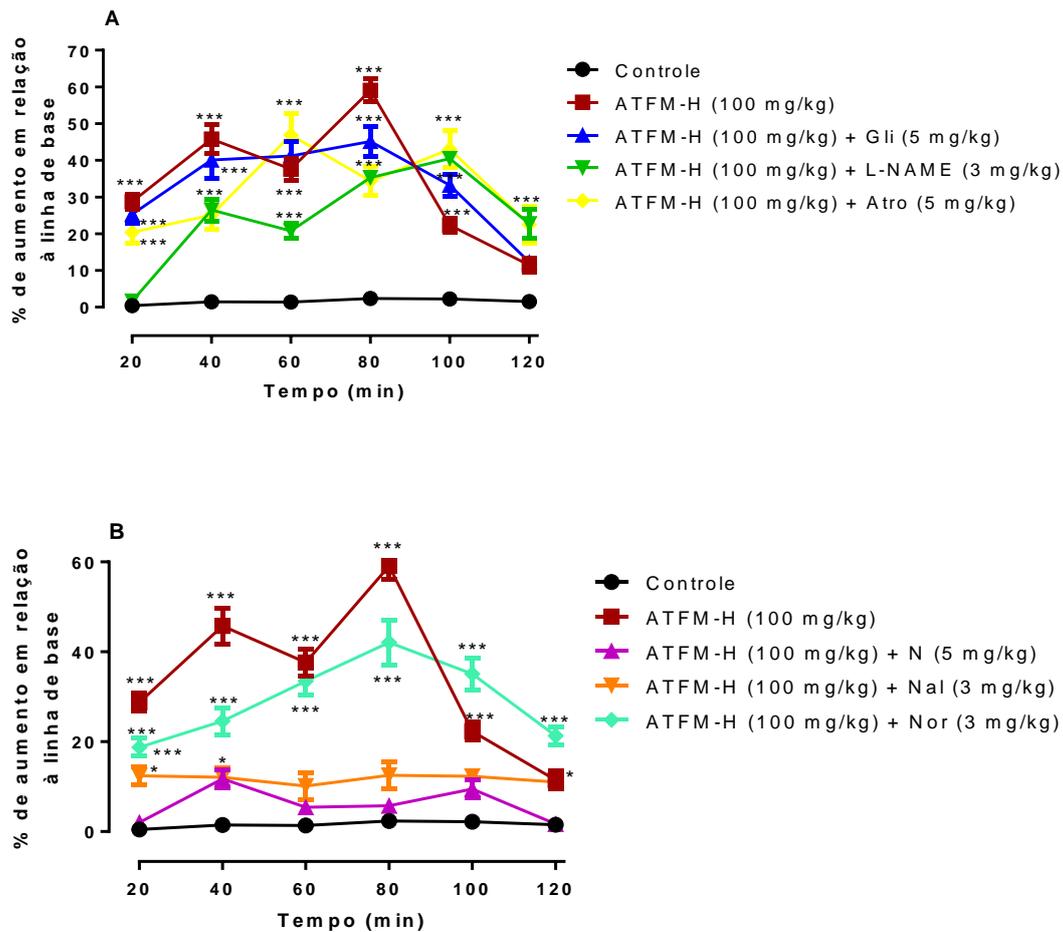


Figura 18 – Efeitos da administração oral prévia de doses crescentes do ATFM-H (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada e morfina (8,15 mg/kg) no modelo de retirada da cauda. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  EPM (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e a partição em hexano em doses crescentes, por Two-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.

Tabela 7 – Efeito do ATFM-H em doses crescentes no modelo de retirada da cauda.

Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos)					
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 $\pm$ 0,6	2,94 $\pm$ 0,9	3,25 $\pm$ 0,9	3,24 $\pm$ 0,6	2,95 $\pm$ 0,8	3,22 $\pm$ 0,6	3,44 $\pm$ 0,3
Morfina	2,89 $\pm$ 0,4	3,11 $\pm$ 0,6	3,52 $\pm$ 0,8	5,05 $\pm$ 0,7***	5,33 $\pm$ 0,8***	4,96 $\pm$ 0,2***	5,13 $\pm$ 0,8***
ATFM-H (10 mg/kg/0)	3,11 $\pm$ 0,7	3,52 $\pm$ 0,4*	3,81 $\pm$ 0,5	3,69 $\pm$ 0,1	3,72 $\pm$ 0,4	3,86 $\pm$ 0,5	3,59 $\pm$ 0,2
ATFM-H (50 mg/kg)	2,98 $\pm$ 0,2	3,95 $\pm$ 0,3*	4,08 $\pm$ 0,9*	4,00 $\pm$ 0,7*	4,24 $\pm$ 0,2**	3,53 $\pm$ 0,1	3,38 $\pm$ 0,8
ATFM-H (100 mg/kg)	2,55 $\pm$ 0,3	3,28 $\pm$ 0,3	3,72 $\pm$ 0,3**	3,51 $\pm$ 0,4*	4,06 $\pm$ 0,2**	3,12 $\pm$ 0,5	2,84 $\pm$ 0,5

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre os tempos de latência da linha de base e os tempos obtidos nas demais medidas em cada grupo, por Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.



**Figura 19 –** Influência da administração prévia de glibenclamida (Gli), N $\omega$ -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), atropina (Atro), naloxona (N), naltrindol (Nal) e nor-binatorfimina (Nor) sobre o efeito antinociceptivo induzido por ATFM-H (100 mg/kg), no modelo de retirada da cauda. Em A, os animais foram tratados por via intraperitoneal com glibenclamida (5 mg/kg), L-NAME (3 mg/kg) e atropina (5 mg/kg) 15 minutos antes da administração da partição. Em B, os animais foram tratados por via intraperitoneal com naloxona (5 mg/kg), naltrindol (3 mg/kg) e nor-binatorfimina (3 mg/kg) 15 minutos antes da administração da partição. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) da % de aumento em relação à linha de base. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com a partição isoladamente e combinada com naloxona, L-NAME, atropina, glibenclamida, naltrindol e nor-binatorfimina, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 8 – Influência da administração prévia de glibenclamida, L-NAME, atropina, naloxona, naltrindol e nor-binaltorfimina sobre os tempos de latência induzidos pela partição em hexano do extrato em metanol de *Annona tomentosa* no modelo de retirada de cauda.**

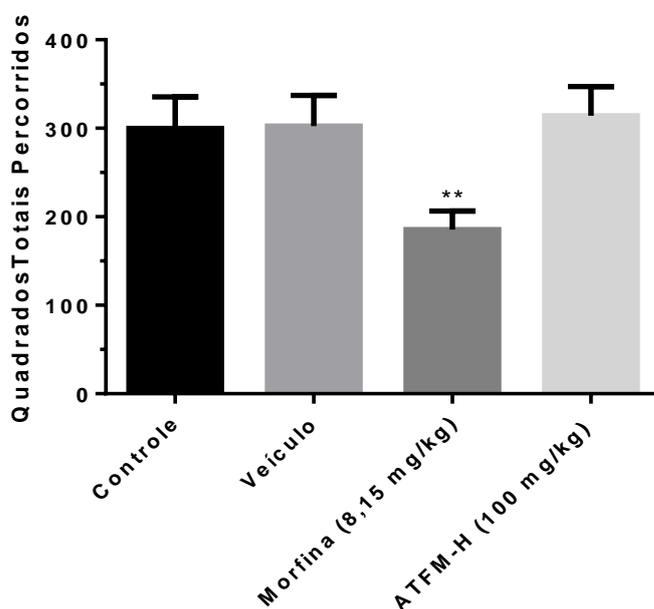
Tratamentos	Linha de Base	Tempo de Latência (segundos)					
		20 min	40 min	60 min	80 min	100 min	120 min
Controle	3,48 ± 0,6	2,94 ± 0,9	3,25 ± 0,9	3,24 ± 0,6	2,95 ± 0,8	3,22 ± 0,6	3,44 ± 0,3
ATFM-H (100 mg/kg)	3,21 ± 0,8	4,13 ± 0,7	4,68 ± 0,6**	4,42 ± 0,2*	5,12 ± 0,2**	3,93 ± 0,4	3,58 ± 0,7
ATFM-H (100 mg/kg) + Glibenclamida (5 mg/kg)	2,88 ± 0,8	3,61 ± 0,5	4,04 ± 0,7**	4,07 ± 0,9**	4,18 ± 0,2**	3,84 ± 0,8*	3,23 ± 0,7
ATFM-H (100 mg/kg) + L-NAME (3 mg/kg)	2,54 ± 0,6	2,58 ± 0,2	3,21 ± 0,8*	3,07 ± 0,7	3,44 ± 0,1*	3,57 ± 0,3**	3,12 ± 0,9
ATFM-H (100 mg/kg) + Atropina (5 mg/kg)	2,66 ± 0,5	3,20 ± 0,5	3,33 ± 0,6*	3,91 ± 0,8**	3,57 ± 0,3**	3,80 ± 0,7**	3,26 ± 0,7
ATFM-H (100 mg/kg) + Naloxona (5 mg/kg)	3,01 ± 0,6	3,07 ± 0,4	3,36 ± 0,7	3,17 ± 0,2	3,18 ± 0,6	3,29 ± 0,7	3,06 ± 0,2
ATFM-H (100 mg/kg) + Naltrindol (3 mg/kg)	3,02 ± 0,3	3,39 ± 0,7*	3,39 ± 0,6	3,33 ± 0,6	3,40 ± 0,4	3,39 ± 0,9	3,35 ± 0,6
ATFM-H (100 mg/kg) + Nor-binaltorfimina (3 mg/kg)	2,98 ± 0,8	3,54 ± 0,6	3,71 ± 0,8	3,98 ± 0,2*	4,23 ± 0,5**	4,03 ± 0,3*	3,62 ± 0,8

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre os tempos de latência da linha de base e os tempos obtidos nas demais medidas em cada grupo, por Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

### 5.1.3 Efeito da partição ATFM-H no modelo do campo aberto

Através da Figura 20, é possível verificar que a partição em hexano do extrato em metanol da *Annona tomentosa* não apresentou efeito significativo na atividade locomotora espontânea dos animais (314 ± 33 quadrados percorridos) em comparação com os grupos controle e veículo na dose de 100 mg/kg. A morfina, por sua vez, reduziu significativamente a atividade locomotora espontânea dos animais em 38,2%

(185,3 ± 21 quadrados totais percorridos). Os dados da Figura 20 estão apresentados na Tabela 9.



**Figura 20 – Avaliação do ATFM-H no modelo do campo aberto. Controle, veículo, ATFM-H (100 mg/kg) e morfina (8,15 mg/kg) foram administrados, por via oral, 60 minutos antes da submissão dos animais ao experimento. Os resultados estão expressos como média ± EPM (n = 6) do número de quadrados totais percorridos pelos animais. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e ATFM-H, por One-Way ANOVA acompanhado pelo teste de Bonferroni.**

**Tabela 9 – Número de quadrados percorridos a partir do modelo do campo aberto.**

Tratamentos	Quadrados percorridos	Percentual de inibição
Controle	299,8 ± 35,6	-
Veículo	302,6 ± 34,5	-
Morfina (8,15 mg/kg)	185,3 ± 21,0**	38,2%
ATFM-H (100 mg/kg)	314,0 ± 33,0	-

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo controle e os grupos veículo, morfina e ATFM-H, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

## **5.2 Modelos de Avaliação da Atividade Anti-inflamatória**

### **5.2.1 Efeito das partições do extrato em metanol das folhas da *Annona tomentosa* no modelo do edema de pata**

Neste modelo, as partições ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Ac e ATFM-Bu, administradas por via oral, na dose de 100 mg/kg inibiram a área sob a curva (ASC) do edema de pata induzido por carragenina em 32,3%, 39,3%, 23% e 6,7%, respectivamente, comparado com o grupo controle, enquanto que a dexametasona (2,25 mg/kg) inibiu a ASC, em aproximadamente 50% (Figura 21). O ATFM-D foi eficaz em inibir o edema de pata em todos os tempos de medição, enquanto que o ATFM-H e ATFM-Ac apenas na medida de 2 horas (Tabela 10).

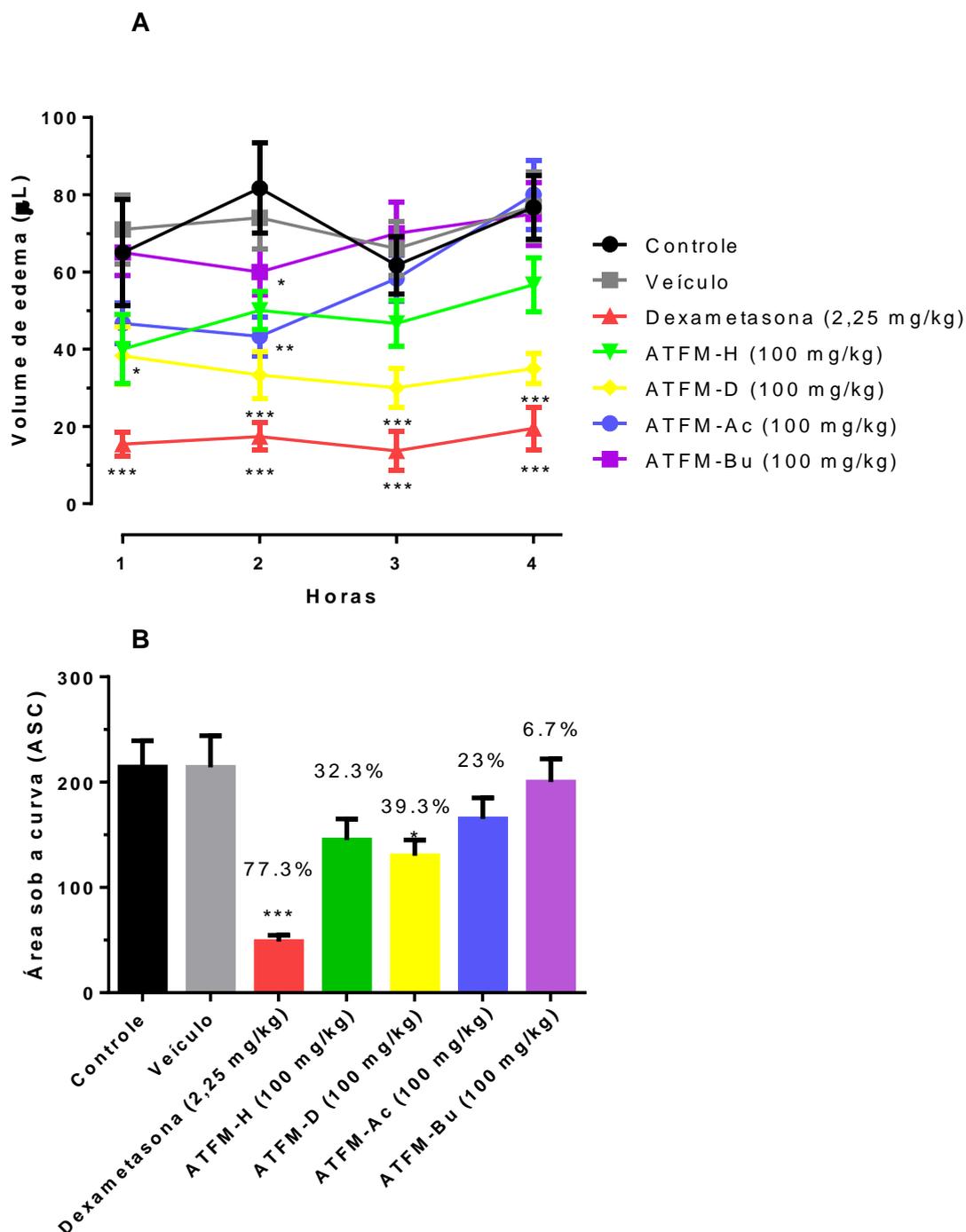


Figura 21 – Efeito da administração oral prévia das partições do ATFM no modelo de edema de pata induzido por carragenina. Em A, os animais foram pré-tratados oralmente com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg, via subcutânea), e as partições ATFM-H, ATFM-D, ATFM-Bu e ATFM-Ac na dose de 100mg/kg. Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A carragenina foi aplicada na pata esquerda traseira dos animais em

todos os grupos e a diferença de volume foi feita em comparação com a pata direita traseira que recebeu água destilada. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6) do volume de edema de pata. A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e as partições, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 10 – Efeito das partições do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa* no modelo de edema de pata induzido por carragenina.**

Tratamentos	Edema de pata (µL)			
	1 Hora	2 Horas	3 Horas	4 Horas
Controle	65 ± 13,8	81,7 ± 11,7	61,7 ± 6,5	76,7 ± 8,2
Veículo	71 ± 9,2	74 ± 8,1	66 ± 7,3	77 ± 9,4
Dexametasona <sup>a</sup>	15,4 ± 3,1***	17,4 ± 3,6***	13,7 ± 5,1***	19,5 ± 5,5***
ATFM-H	40 ± 8,9	50 ± 5,0*	46,7 ± 6,0	56,7 ± 7,7
ATFM-D	38,3 ± 7,5*	33,3 ± 6,0***	30 ± 5,0***	35 ± 4,0***
ATFM-Ac	46,7 ± 5,2	43,3 ± 5,0**	58,3 ± 6,2	80 ± 8,9
ATFM-Bu	65 ± 6,2	60 ± 6,4	70 ± 8,1	75 ± 8,3

\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo controle e os grupos tratados com veículo, dexametasona e as partições do ATFM, por Two-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.  
<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.

Em relação ao edema de pata induzido por histamina, o ATFM-D, nas doses de 50 e 100 mg/kg, foi capaz de reduzir significativamente (p < 0,001), na dose de 10 mg/kg, o edema em todos os tempos de medição, em relação ao grupo veículo. Quando administrado na dose de 10 mg/kg, a partição em diclorometano reduziu significativamente (p < 0,001) o edema somente 2 horas após a administração da histamina, em comparação com o grupo veículo. Conforme podemos visualizar na Figura 22, o efeito antiedematogênico da partição em diclorometano apresentou-se de maneira dose-dependente. A dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) inibiu significativamente o edema (p < 0,001; tempo de uma hora) (p < 0,05; tempo de duas horas) induzido por histamina, quando comparada com o grupo veículo (Tabela 11).

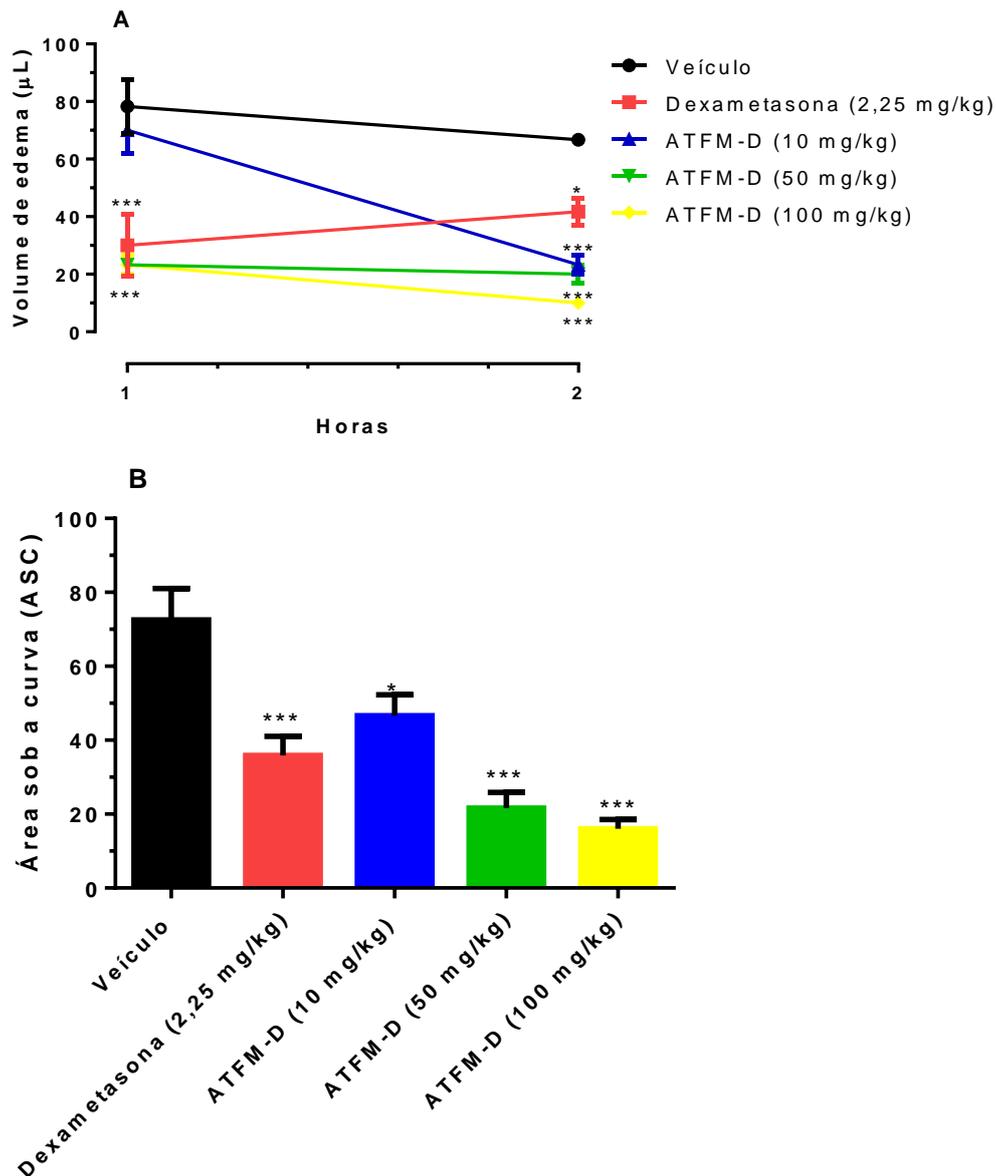


Figura 22 – Efeito do ATFM-D no modelo do edema de pata induzido por histamina. Em A, os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A histamina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com água destilada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 11 – Efeito da partição em diclorometano do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa* no modelo de edema de pata induzido por histamina.**

Tratamentos	Edema de pata (µL)	
	1 Hora	2 Horas
Veículo	78,3 ± 9,46	66,7 ± 2,11
Dexametasona <sup>a</sup> (2,25 mg/kg)	30,0 ± 10,6***	41,7 ± 4,77*
ATFM-D – 10 mg/kg	70,0 ± 8,2	23,3 ± 3,3***
ATFM-D – 50 mg/kg	23,3 ± 2,0***	20,0 ± 3,1***
ATFM-D – 100 mg/kg	23,3 ± 3,4***	10,0 ± 1,5***

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo veículo e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.

O ATFM-D, em todas as doses testadas (10, 50 e 100 mg/kg) foi capaz de reduzir significativamente ( $p < 0,001$ ) o edema de pata em todos os períodos observados após a administração de serotonina em comparação com o grupo veículo. O efeito antiedematogênico do ATFM-D no modelo de edema de pata induzido por serotonina apresentou-se de maneira dose-dependente, conforme Figura 23. A dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) reduziu significativamente o edema de pata ( $p < 0,001$ ; tempo de uma hora) ( $p < 0,01$ ; tempo de duas horas) induzido por serotonina, em relação ao grupo veículo (Tabela 12).

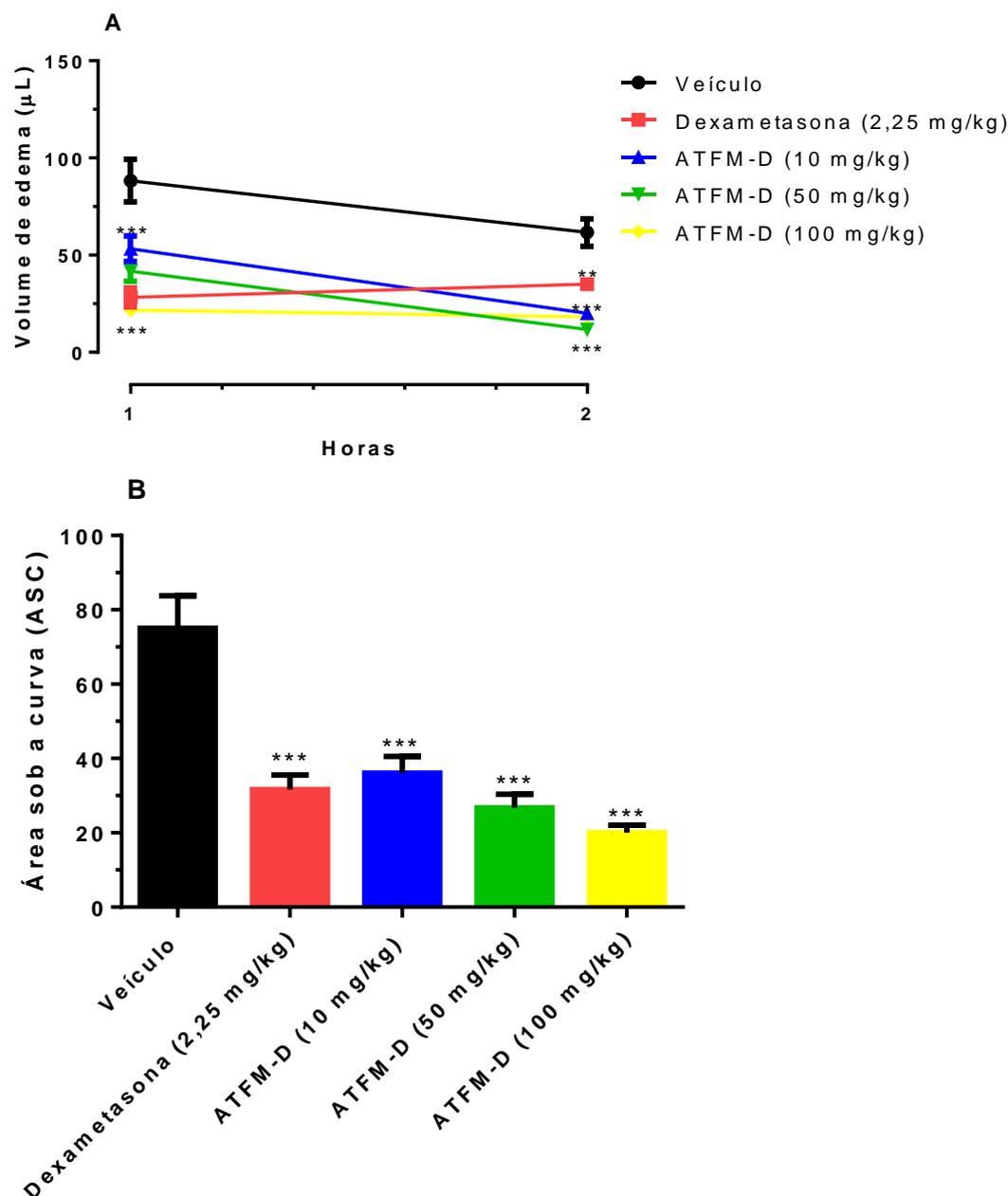


Figura 23 – Efeito do ATFM-D, em doses crescentes, no modelo do edema de pata induzido por serotonina. Em A, os animais foram pré-tratados com veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Em B, o gráfico representa a área sob a curva calculada para cada curva. A serotonina foi aplicada na pata esquerda dos animais em todos os grupos e a diferença entre o volume foi feita em comparação com a pata direita, injetada com água destilada. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do volume de edema da pata. A significância estatística (\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo veículo e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 12 – Efeito da partição em diclorometano do extrato metanólico de folhas da *Annona tomentosa* no modelo de edema de pata induzido por serotonina.**

Tratamentos	Edema de pata (µL)	
	1 H	2 H
Veículo	88,3 ± 10,78	61,7 ± 7,03
Dexametasona <sup>a</sup> (2,25 mg/kg)	28,3 ± 4,77***	35,0 ± 2,24**
ATFM-D – 10 mg/kg	53,3 ± 6,5***	20,0 ± 2,0***
ATFM-D – 50 mg/kg	41,7 ± 5,1***	11,7 ± 2,8***
ATFM-D – 100 mg/kg	21,7 ± 3,2***	18,3 ± 3,2***

\*  $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  e \*\*\* $p < 0,001$  foram calculados entre o grupo veículo e os grupos tratados com dexametasona e doses crescentes de ATFM-D, por Two-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.

### **5.2.2 Efeito da partição ATFM-D sobre a migração de leucócitos totais no modelo da bolsa de ar subcutânea estéril**

O tratamento prévio com a partição ATFM-D, em doses crescentes (10, 50 e 100 mg/kg), inibiu a migração de leucócitos totais para a bolsa de ar subcutânea estéril em aproximadamente 54%, 76% e 93% (Tabela 13), respectivamente, sendo esta inibição significativa nas doses de 50 e 100 mg/kg, numa redução dose-dependente (Figura 24). O anti-inflamatório esteroide dexametasona inibiu significativamente a migração em aproximadamente 61%.

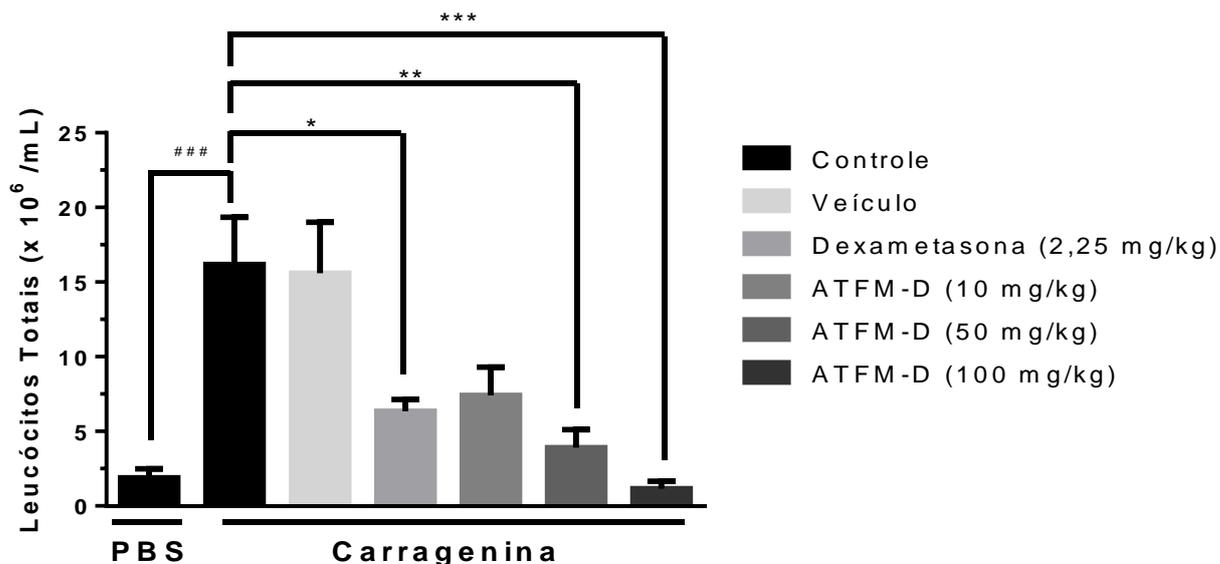


Figura 24 – Efeito do ATFM-D na migração de leucócitos totais a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os animais foram pré-tratados com água destilada, veículo, dexametasona (2,25 mg/kg; via subcutânea) e ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg). Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do número de leucócitos totais. A significância estatística (\* p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (# p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 13 – Efeito da partição em diclorometano do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa* sobre a migração leucocitária no modelo de bolsa de ar subcutânea.**

Tratamentos (oral – subcutânea)	Número de Leucócitos Totais (x 10 <sup>6</sup> /mL)	Percentual de inibição
Controle – PBS	1,88 ± 0,6	---
Controle – Carragenina	16,18 ± 3,17 <sup>###</sup>	---
Veículo – Carragenina	15,60 ± 3,40	---
Dexametasona <sup>a</sup> (2,25 mg/kg) – Carragenina	6,34 ± 0,8*	60,82%
ATFM-D (10 mg/kg) – Carragenina	7,41 ± 1,9	---
ATFM-D (50 mg/kg) – Carragenina	3,91 ± 1,2**	75,83%
ATFM-D (100 mg/kg) – Carragenina	1,15 ± 0,5***	92,89%

\*p < 0,05, \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

#p < 0,05, ##p < 0,01 e ###p < 0,001 foram calculados entre o grupo que recebeu água destilada por via e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA, seguida pelo teste de Bonferroni.

<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.

### **5.2.3 Efeito da partição ATFM-D sobre a produção e/ou liberação de citocinas no modelo da bolsa de ar subcutânea estéril**

O tratamento prévio com a partição ATFM-D, em doses crescentes, suprimiu a produção e/ou liberação de ambas as citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  (Figura 25) e IL-1 $\beta$  (Figura 26) no lavado subcutâneo coletado a partir do modelo de bolsa de ar subcutânea estéril. As doses de 50 e 100 mg/kg de ATFM-D inibiram significativamente a produção de TNF- $\alpha$  em aproximadamente 43% e 67%, respectivamente (Tabela 14), enquanto que a dose de 100 mg/kg de ATFM-D inibiu significativamente a produção de IL-1 $\beta$  em aproximadamente 35% (Tabela 15). O anti-inflamatório esteroide dexametasona inibiu a produção e/ou liberação de ambas as citocinas.

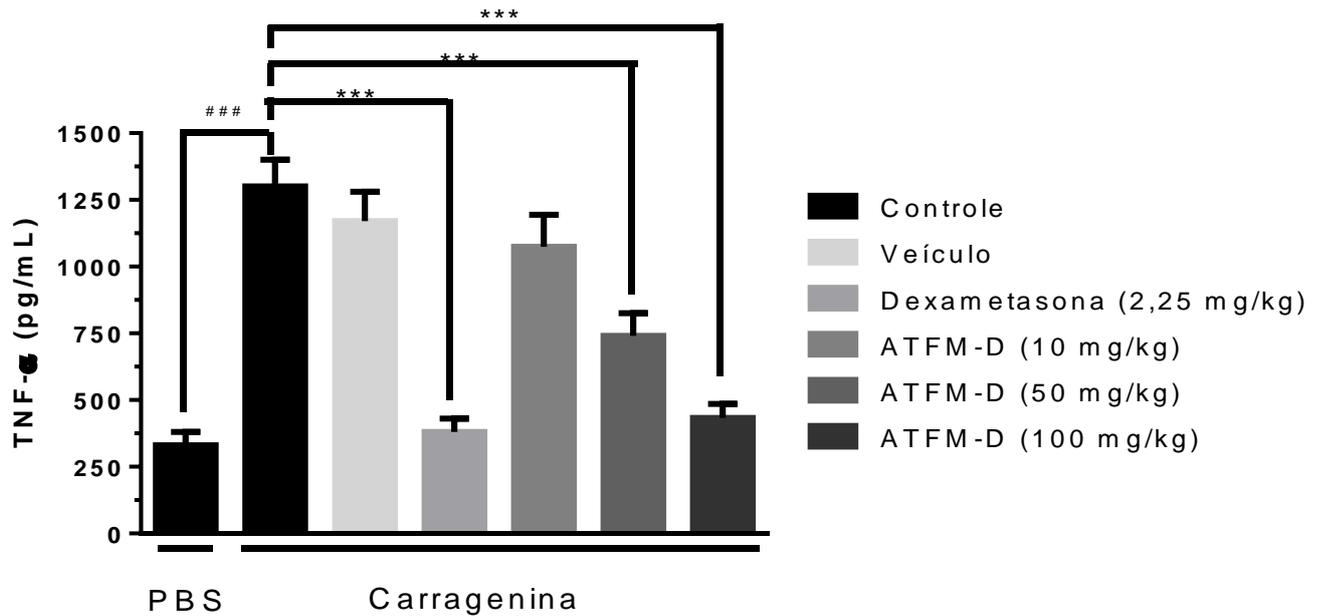


Figura 25 – Efeito de doses crescentes de ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada, veículo e dexametasona (2,25 mg/kg) sobre a produção e/ou liberação de TNF- $\alpha$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os tratamentos foram realizados por via oral, exceto a dexametasona a qual foi administrada por via subcutânea. Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas soluções de PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média + E.P.M. (n = 6). A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

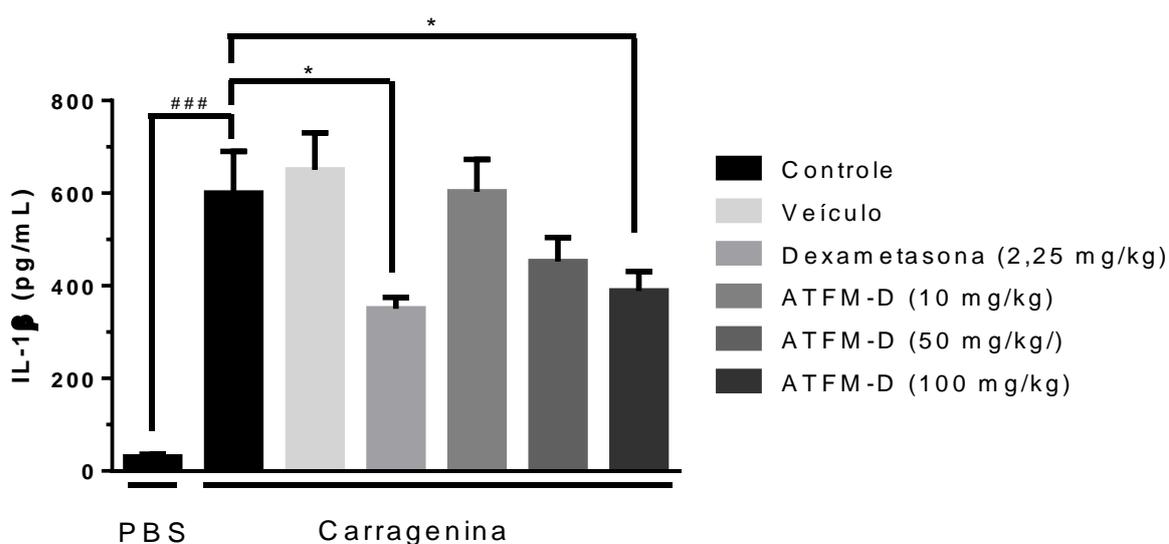
**Tabela 14 – Efeito do ATFM-D em doses crescentes sobre a produção e/ou liberação de TNF- $\alpha$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea.**

Tratamentos (oral-subcutânea)	Quantificação de TNF- $\alpha$ (pg/mL)	Percentual de inibição
Controle – PBS	330,0 $\pm$ 50,2	---
Controle – Carragenina	1300,0 $\pm$ 100,6 <sup>###</sup>	---
Veículo – Carragenina	1170,0 $\pm$ 110,3	10,0%
Dexametasona <sup>a</sup> (2,25 mg/kg) – Carragenina	380,0 $\pm$ 50,3 <sup>***</sup>	70,8%
ATFM-D (10 mg/kg) – Carragenina	1074,0 $\pm$ 120,6	---
ATFM-D (50 mg/kg) – Carragenina	740,0 $\pm$ 85,7 <sup>***</sup>	43,1%
ATFM-D (100 mg/kg) – Carragenina	433,8 $\pm$ 52,1 <sup>***</sup>	66,6%

\* p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001 foram calculados entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.



**Figura 26 – Efeito de doses crescentes de ATFM-D (10, 50 e 100 mg/kg), água destilada, veículo e dexametasona (2,25 mg/kg) sobre a produção e/ou liberação de IL-1 $\beta$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea. Os tratamentos foram realizados por via oral, exceto a dexametasona que foi**

administrada por via subcutânea. Na bolsa de ar subcutânea foram aplicadas soluções de PBS e carragenina. Os resultados estão expressos como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A significância estatística (\*p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo e a significância estatística (#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001) foi calculada entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni.

**Tabela 15 – Efeito do ATFM-D em doses crescentes sobre a produção e/ou liberação de IL-1 $\beta$  a partir do modelo da bolsa de ar subcutânea.**

Tratamentos (oral-subcutânea)	Quantificação de IL-1 $\beta$ (pg/mL)	Percentual de inibição
Controle – PBS	30,4 $\pm$ 6,2	---
Controle – Carragenina	600,4 $\pm$ 90,5 <sup>###</sup>	---
Veículo – Carragenina	650,0 $\pm$ 80,4	---
Dexametasona <sup>a</sup> (2,25 mg/kg) – Carragenina	350,4 $\pm$ 25,4*	41,6%
ATFM-D (10 mg/kg) – Carragenina	603,2 $\pm$ 70,3	---
ATFM-D (50 mg/kg) – Carragenina	452,3 $\pm$ 52,5	---/
ATFM-D (100 mg/kg) – Carragenina	388,7 $\pm$ 42,3*	35,3%

\* p < 0,05; \*\*p < 0,01 e \*\*\*p < 0,001 foram calculados entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e carragenina na bolha de ar subcutânea e os grupos tratados com veículo, dexametasona e doses crescentes de ATFM-D os quais receberam carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

#p < 0,05; ##p < 0,01 e ###p < 0,001 entre o grupo que recebeu água destilada por via oral e PBS na bolha de ar subcutânea e o que recebeu água destilada por via oral e carragenina no espaço subcutâneo, por One-Way ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni.

<sup>a</sup>Dexametasona foi administrada por via subcutânea.

## 6 DISCUSSÃO

As plantas medicinais têm contribuído ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos até hoje amplamente utilizados na prática clínica. Como exemplo de fármacos extraídos de plantas, podemos citar a morfina, a emetina, a vincristina, a colchicina e a rutina (CECHINEL-FILHO e YUNES, 1998). No presente estudo, demonstramos pela primeira vez o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório e o possível mecanismo de ação de partições de diferentes polaridades, obtidos a partir do extrato em metanol das folhas da *Annona tomentosa*. Vários modelos experimentais de nocicepção e inflamação aguda foram realizados em camundongos para alcançar os objetivos propostos. O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o modelo de retirada da cauda elucidaram a atividade periférica e central, respectivamente (VONGTAU et al., 2004). Os animais também foram submetidos aos modelos de edema de pata e da bolsa de ar subcutânea a fim de descrever o efeito anti-inflamatório dos extratos e partições da *A. tomentosa*.

Para iniciar o nosso estudo, avaliamos o efeito dos extratos em metanol brutos das cascas do caule (ATCM) e das folhas (ATFM) da *A. tomentosa* no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O modelo de contorções abdominais, descrito como um modelo típico de dor inflamatória, é um método químico utilizado para induzir dor de origem periférica (dor somático-visceral), através da injeção de princípios irritantes, tais como o ácido acético, em camundongos (GAWADE, 2012) e tem sido amplamente utilizado como uma ferramenta para pesquisar novas drogas analgésicas (que agem em nível periférico, espinal ou supraespinal) e/ou anti-inflamatórias (COLLIER et al., 1968).

Quando o ácido acético é administrado na cavidade peritoneal, um processo inflamatório agudo instala-se, com aumento dos níveis das enzimas COX e LOX no fluido peritoneal. Indiretamente, o ácido acético causa a liberação de mediadores endógenos que estimulam os nociceptores, tais como histamina, serotonina, citocinas (IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-8), substância P, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) (JIA et al., 2016; ZAKARIA et al., 2016), produzindo como resposta comportamental as contorções abdominais (FISCHER et al., 2008). Estes mediadores endógenos, por sua vez, excitam os neurônios nociceptivos periféricos na cavidade peritoneal que são sensíveis aos AINEs, bem como aos opioides (ZAKARIA et al., 2016). Além disso, o ácido acético

pode estimular diretamente os receptores sensíveis a ácidos, através da liberação de prótons  $H^+$  nos fluidos peritoneais (NGUELEFACK et al., 2004).

O extrato em metanol ATFM, bem como suas partições ATFM-H (50 mg/kg e 100 mg/kg) e ATFM-D (100 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente as contorções abdominais, quando comparados ao grupo controle, sugerindo possível atividade antinociceptiva periférica e/ou central. As doses crescentes do ATFM-H reduziram de maneira dose-dependente as contorções abdominais induzidas por ácido acético. De maneira semelhante, o analgésico opioide morfina (5,01 mg/kg), utilizada como controle positivo neste modelo, também inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Embora seja um modelo sensível, o modelo de contorções abdominais não é específico, sugerindo o envolvimento de diferentes mecanismos nociceptivos na redução da contração muscular abdominal, uma vez que as contorções abdominais também podem ser inibidas por relaxantes musculares e outras drogas (JIA et al., 2016), como anti-histamínicos, anti-inflamatórios (NGUELEFACK et al., 2004). Assim, faz-se necessário investigar o efeito antinociceptivo através de outros modelos de nocicepção, como o modelo de retirada da cauda, a fim de esclarecer a ação dos extratos e partições em estudo (ABDOLLAHI; KARIMPOUR; MONSEF-ESFEHANI, 2003).

O modelo de retirada da cauda é um modelo de nocicepção induzida por estímulo térmico amplamente utilizado para investigar substâncias que agem no SNC, tais como os analgésicos opioides (MILANO et al., 2008; ZHANG et al., 2009; YI et al., 2012; DAS et al., 2015). Consiste na aplicação térmica de uma fonte radiante de calor na cauda do animal provocando seu movimento de retirada (D'AMOUR; SMITH, 1941), reflexo mediado pela medula espinal através da estimulação direta das fibras nociceptivas aferentes primárias (JANSSEN et al., 1963; OLIVEIRA et al., 2008); e a antinocicepção é quantificada pelo prolongamento do tempo de reação, caracterizando-se por uma nocicepção aguda de caráter não-inflamatório.

Administramos no modelo de retirada da cauda, as partições ATFM-H e ATFM-D e nossos resultados demonstram que apenas a partição em hexano foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência da retirada da cauda em todas as doses testadas (10, 50 e 100 mg/kg). Desta forma, podemos sugerir que a partição em hexano do extrato em metanol das folhas da *A. tomentosa* tenha efeito antinociceptivo central. O ATFM-D, por sua vez, não preveniu este tipo de nocicepção, sugerindo que seu efeito antinociceptivo seja independente da ação central e pode estar relacionado a processos

inflamatórios, mas não a estímulos térmicos. Neste modelo, a morfina apresentou uma ação mais tardia em comparação com o ATFM-H, com ação significativa apenas 60 minutos após a administração do extrato. A morfina, quando administrada por via oral, sofre intenso metabolismo hepático de primeira passagem, o que reduz a biodisponibilidade deste fármaco em aproximadamente 75%, justificando, assim, sua ação mais tardia (YARKISH; WALLACE, 2012).

A hipótese dos receptores opioides estarem envolvidos no mecanismo de ação do ATFM-H foi inicialmente investigada pela tentativa de reverter a antinocicepção após a administração prévia de naloxona (antagonista não seletivo de receptores opioides). A pré-administração da naloxona foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo do ATFM-H, demonstrando um importante envolvimento da partição em hexano em ativar receptores opioides para produzir a antinocicepção. Em seguida, analisamos a participação de subtipos de receptores opioides no mecanismo de ação do ATFM-H. A habilidade do naltrindol (antagonista seletivo de receptor opioide  $\delta$ ), administrado previamente, mas não da nor-binaltorfimina (antagonista seletivo de receptor opioide  $\kappa$ ), de bloquear a resposta antinociceptiva produzida pelo ATFM-H sugere que o efeito antinociceptivo produzido pelo ATFM-H foram mediados principalmente pela ativação dos receptores opioides do tipo  $\delta$ .

Os receptores opioides delta, também conhecidos como receptores  $\delta$ , receptores DOR ou DOP, representam um alvo promissor no desenvolvimento de novos analgésicos. De acordo com a distribuição do RNAm em roedores, os receptores  $\delta$  no SNC de humanos são expressos em regiões corticais e estruturas límbicas, como hipocampo e amígdala, bem como nos gânglios da base e hipotálamo (CHUNG; KIEFFER, 2013). Estudos utilizando camundongos *knockout* para receptor opioide  $\delta$  não demonstraram mudanças significativas na sua sensibilidade à dor aguda (GAVERIAUX-RUFF et al., 2008; PRADHAN et al., 2011); por outro lado, camundongos *knockout* para receptor opioide  $\delta$  apresentaram dor inflamatória e neuropática aumentadas (NADAL et al., 2006; GAVERIAUX-RUFF et al., 2008), sugerindo, portanto, o envolvimento dos receptores DOR no alívio da dor crônica.

Outros antagonistas, como L-NAME, atropina, glibenclamida foram administrados previamente na tentativa de elucidar outros possíveis mecanismos de ação da partição ATFM-H, ainda no modelo de retirada da cauda, porém nenhum deles reverteu o efeito antinociceptivo desta partição, sugerindo que os sistemas muscarínico

e nitrérgico não sejam acionados durante o efeito do ATFM-H, bem como os canais de  $K_{ATP}$ .

O L-NAME foi administrado previamente para investigarmos a participação do NO na antinocicepção produzida pelo ATFM-H. O NO é um radical livre e gasotransmissor, que regula várias funções biológicas no organismo (VANNINI et al., 2015). É derivado da L-arginina por ação de isoformas da enzima óxido nítrico sintase, as quais podem ser bloqueadas por ação do L-NAME (NAPOLI et al., 2013). Embora o NO tenha um papel nas vias nociceptivas, várias linhas de evidência indicam que o NO produz analgesia, sugerindo o duplo efeito do NO no sistema nociceptivo. O efeito antinociceptivo do NO envolve a geração de GMPc uma vez que o NO estimula a enzima guanilato ciclase solúvel (CURY et al., 2011). Várias linhas de evidência têm sugerido uma ligação entre a ativação da via NO-GMPc e a abertura dos canais  $K_{ATP}$  (FERREIRA et al., 1991; CURY et al., 2011). Em 1991, o prof. Sérgio Henrique Ferreira e seus colaboradores evidenciaram que a analgesia produzida pela administração periférica de morfina é subsequente à ativação da via NO-GMPc, indicando o envolvimento do NO na ação analgésica de opioides. Nossos resultados não demonstraram a interferência da administração prévia de L-NAME sobre o efeito antinociceptivo da partição em hexano, indicando o não envolvimento do NO neste efeito.

Para verificar se os canais  $K_{ATP}$  poderiam mediar o efeito antinociceptivo do ATFM-H foi administrado previamente glibenclamida, um bloqueador destes canais. Existem vários estudos na literatura demonstrando que o efeito antinociceptivo induzido por agonistas de receptores opioides é acentuadamente atenuado por bloqueadores de canais  $K_{ATP}$ , tais como a glibenclamida, indicando o envolvimento destes canais no processo de nocicepção (OCAÑA et al., 2004). Uma vez ativados, é observado um aumento no efluxo de  $K^+$  capaz de alterar o potencial de repouso da célula. Assim, a hiperpolarização da membrana leva à uma redução na entrada de  $Ca^{2+}$  diminuindo, subsequentemente a liberação de neurotransmissores (LOHMANN e WELCH, 1999). Neste trabalho, a glibenclamida, administrada previamente, não foi capaz de reverter o efeito induzido pelo ATFM-H, sugerindo que estes canais não estejam envolvidos no mecanismo de ação desta partição.

Continuando nossa busca por evidenciar o mecanismo de ação da partição ATFM-H, administramos previamente atropina, um antagonista muscarínico não seletivo, a fim de investigar a possível participação da via colinérgica no efeito da

partição. Estudos têm demonstrando que o sistema colinérgico tem importância fundamental no controle endógeno da dor. Algumas vias de controle nociceptivo, como as vias adrenérgica e serotoninérgica são, em parte, moduladas pelo sistema colinérgico e a administração de agonistas colinérgicos aumentam a liberação de neurotransmissores inibitórios como o GABA e a glicina e inibem a liberação de glutamato (JONES e DUNLOP, 2007). No entanto, o sistema colinérgico não parece estar envolvido no mecanismo de ação da partição em hexano uma vez que a atropina não foi capaz de alterar este efeito.

Como a maioria dos métodos de avaliação de nociceção envolve uma resposta comportamental dos animais, resultados falso-positivos podem ser obtidos caso os extratos testados promovam sedação ou imobilização, comprometendo a coordenação motora dos animais, bem como a expressão de comportamentos nociceptivos (SOJA et al., 2002), tal como o reflexo de retirada no modelo de retirada da cauda. Por esse motivo, submetemos os animais ao modelo do campo aberto uma hora após a administração do ATFM-H (100 mg/kg) e nossos resultados sugerem que a capacidade sensorial e motora dos animais permaneceu intacta, excluindo a possibilidade de efeitos inespecíficos, tais como sedação ou disfunção motora no efeito antinociceptivo da partição em hexano. A morfina (8,15 mg/kg), por sua vez, reduziu significativamente a atividade locomotora espontânea dos animais em relação ao grupo controle.

Neste estudo, também investigamos a atividade anti-inflamatória das partições do extrato em metanol de folhas da *A. tomentosa*, através modelos de avaliação da atividade anti-inflamatória, e o seu papel na liberação de mediadores inflamatórios.

Um modelo clássico amplamente utilizado para estudar a atividade anti-inflamatória de novos fármacos, bem como para estudar os mecanismos envolvidos na inflamação é o modelo de edema de pata induzido por carragenina (POSADAS et al., 2004).

A carragenina é polissacarídeo sulfatado tendo como principal fonte *Chondrus crispus*, uma alga marinha também conhecida como “Irish moss” ou “carragheen moss”, da Carragheen (Waterford, Irlanda). Embora esta alga seja sua principal fonte, material com composição e propriedades físicas semelhantes foi isolado de outras algas marinha, tais como *Gigartina stellata*, *Rhodymenia palmata*, *Hypnea musciformis*, *Eucheuma spinosum*. Em 1945, Tseng propôs que o nome carragenina, contudo, fosse utilizado apenas para designar o polissacarídeo extraído das algas *Chondrus crispus* e *Gigartina stellata*. O polissacarídeo carragenina pode ser fracionado em dois compostos. Uma

fração transforma-se em gel sob ação do íon potássio e foi designada como  $\kappa$ -carragenina e outra fração, mais insensível ao íon potássio, foi denominada  $\lambda$ -carragenina (DI ROSA, 1972). Esta última é a fração mais ativa como irritante em induzir ambas respostas inflamatórias aguda e crônica e o seu uso para induzir a formação de edema na pata de ratos foi introduzido pela primeira vez por Winter e seus colaboradores, em 1962. Posteriormente, Levy (1969) demonstrou que a carragenina pode ser utilizada para induzir edema de pata em camundongos. E foi através deste modelo que os pesquisadores da Merck, Sharp & Dohme demonstraram a atividade anti-inflamatória da indometacina. Portanto, esse modelo foi e continua sendo importante para o desenvolvimento de novas drogas com potencial anti-inflamatório (MORRIS, 2003; WILLOUGHBY, 2003).

O processo inflamatório induzido pela carragenina é um processo agudo, não imune, altamente reproduzível e bem caracterizado. Quando administrada por via subcutânea na região plantar da pata do animal, a carragenina é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação os quais se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios derivados do plasma ou das células envolvidas na resposta inflamatória (MORRIS, 2003).

A inibição da inflamação induzida por carragenina é altamente preditiva à atividade de drogas anti-inflamatórias em doenças inflamatórias humanas. Usando antagonistas de vários mediadores da inflamação, Di Rosa e colaboradores (1971) mostraram que a resposta inflamatória à carragenina consiste de três fases. A primeira fase ocorre na primeira hora após a administração da carragenina e é mediada tanto por histamina quanto por serotonina, após a qual a permeabilidade vascular aumentada é mantida na segunda hora pela liberação de cininas, notavelmente o nonapeptídeo bradicinina produzida pela caliceína. A fase final e de maior intensidade ocorre cerca de três horas após a injeção de carragenina e é atribuída à ação local de PGs sobre a permeabilidade vascular e cuja liberação está intimamente relacionada à infiltração de leucócitos para o local inflamado (DI ROSA; WILLOUGHBY, 1971). Este modelo, portanto, é considerado uma ferramenta vital no desenvolvimento de AINEs e de inibidores da COX desenvolvidos recentemente.

A avaliação de AINEs neste modelo mostra que eles suprimem principalmente a última fase da resposta, chamada de fase das PGs. Sua habilidade para suprimir esta fase correlaciona-se diretamente com sua habilidade em suprimir a migração de leucócitos para o tecido inflamado, os quais são capazes de amplificar a resposta inflamatória, com

a produção de outros mediadores inflamatórios, de EROs, aumento da atividade da mieloperoxidase e da produção de NO. Assim, o edema e sua supressão durante o período de 2 e ½ a 6 horas após a injeção de carragenina serve com um índice da migração leucocitária. Isto explica porque um modelo de inflamação aguda pode, com sucesso, ser empregado na pesquisa por novos AINEs (DI ROSA; PAPADIMITRIOU; WILLOUGHBY, 1971).

Neste estudo, nossos resultados demonstram que, entre as partições do extrato em metanol de folhas da *A. tomentosa* testadas, o ATFM-D, na dose de 100 mg/kg, foi eficaz em inibir significativamente o edema de pata induzido por carragenina, em todos os tempos de medição.

A fim de melhor caracterizar o envolvimento da partição em diclorometano em inibir o edema de pata e sua influência sobre os mediadores histamina e serotonina na mediação de seu efeito anti-inflamatório, avaliamos o efeito do ATFM-D nos edemas de pata induzidos pela injeção intraplantar de histamina e serotonina.

Sabe-se que a histamina é uma amina vasoativa que desempenha papel fundamental no processo inflamatório por aumentar a permeabilidade vascular, que inicia uma vasodilatação desencadeada pela ligação da mesma aos receptores H<sub>1</sub> presentes nas células endoteliais. A histamina age principalmente nas vênulas pós-capilares onde a abertura das junções endoteliais levaria ao extravasamento aumentado de proteínas plasmáticas, com consequente contração e separação das células endoteliais permitindo, dessa forma, a diapedese dos leucócitos (AMANN et al., 1995). O principal local de armazenamento da histamina na maioria dos tecidos é nos grânulos citoplasmáticos nos mastócitos e na corrente sanguínea, nos basófilos (KUMAR et al., 2010). É relevante também destacar que a histamina tem um efeito ativador sobre a fosfolipase A<sub>2</sub>, enzima responsável pela liberação do AA a partir dos fosfolípidios de membrana e, portanto, envolvida na produção final de PGs (GROSSER et al., 2012). Uma vez que tanto a histamina quanto a serotonina atuam em curto prazo no processo inflamatório agudo (KUMAR et al., 2010; RANG et al., 2011) nossas análises foram concentradas apenas nas duas primeiras horas após a administração destas substâncias.

A serotonina, assim como a histamina, é um mediador vasoativo pré-formado que age sobre receptores específicos e apresenta ações semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. É produzida pelas células enterocromafins, no

epitélio do trato gastrointestinal, e absorvida por plaquetas (RACKÉ; SCHWORER, 1991; BARNES, 2001).

Como o ATFM-D foi eficaz em reduzir significativamente os edemas de pata induzidos por histamina e serotonina em todas as doses testadas (10, 50 e 100 mg/kg), num comportamento dose-dependente, e em ambos os tempos de medição, pode-se inferir que o mecanismo pelo qual a partição em diclorometano exerça seu efeito anti-inflamatório parece ser capaz de afetar a resposta desencadeada por ambas as aminas vasoativas.

Desse modo, a capacidade do ATFM-D em reduzir a formação dos edemas de pata induzidos por carragenina, histamina e serotonina sugere que esta partição seja capaz de interferir no estabelecimento inicial do processo inflamatório, uma vez que estes mediadores são os mais importantes nesta fase do processo inflamatório agudo.

Para que pudéssemos avaliar a capacidade do ATFM-D de interferir no processo de migração leucocitária e na produção das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , realizamos outro modelo de avaliação da atividade anti-inflamatória, o modelo da bolsa de ar subcutânea estéril.

A bolsa de ar subcutânea é um modelo *in vivo* que pode ser realizado para estudar tanto a inflamação aguda quanto a inflamação crônica e a resolução da resposta inflamatória, pois permite que o influxo celular, os mediadores inflamatórios e o extravasamento plasmático sejam quantitativamente mensurados após um processo inflamatório agudo induzido por agentes irritantes (em nosso estudo, utilizamos a carragenina) aplicados no interior da cavidade (SEDGWICK; LEES, 1986). A bolsa de ar, composta por uma linhagem de células que consiste principalmente de macrófagos e fibroblastos similar à constituição celular da cavidade sinovial, é formada através da injeção subcutânea de ar estéril no dorso do animal. A injeção de substâncias irritantes, tal como a carragenina, na bolsa de ar produz uma resposta inflamatória caracterizada pela infiltração de células, aumento do exsudato e uma produção acentuada de mediadores, tais como PGs, LTs e citocinas, bem como a diapedese leucocitária, principalmente de neutrófilos. Estes parâmetros podem ser quantificados e utilizados para determinar o grau da inflamação, a resolução deste processo ou a identificação de novos agentes anti-inflamatórios (JAIN et al, 2011; DUARTE et al, 2012).

A migração de leucócitos para o tecido lesionado é um processo importante que ocorre numa fase mais tardia da resposta inflamatória e é dependente da produção e liberação de agentes quimiotáticos, como produtos da lipoxigenase (LTB<sub>4</sub>) e

quimiocinas (IL-8). Este processo é constituído por eventos como a marginalização e rolamento dos leucócitos, sua aderência às células endoteliais e transmigração em direção ao local da injúria. Agentes anti-inflamatórios podem reduzir a migração celular por impedir a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou bloquear alguma fase da migração leucocitária (MULLER, 2003).

Nossos resultados mostram um significativo influxo celular na bolsa de ar subcutânea estéril após a injeção de carragenina. Esta migração foi significativamente reduzida, de maneira dose-dependente pela partição ATFM-D (50 e 100 mg/kg), assim como pela dexametasona (2,25 mg/kg).

O TNF- $\alpha$  é amplamente considerado a citocina pró-inflamatória chave devido ao seu papel de iniciar uma cascata de ativação de outras citocinas e fatores de crescimento na resposta inflamatória. Após a injúria ou durante a inflamação, o TNF- $\alpha$  é sintetizado e liberado por uma série de tipos celulares, tais como fagócitos mononucleares, neutrófilos, linfócitos e mastócitos. O TNF- $\alpha$  também pode ser produzido em resposta a outros estímulos extracelulares como outras citocinas, choque térmico, isquemia, luz UV e infecções microbianas (ALWANI et al., 2006). O TNF- $\alpha$  exerce potentes efeitos inflamatórios: induz a expressão endotelial de ICAM-1 e VCAM-1 (LAMPINEN et al., 2004; CUZZOCREA, 2005); é um potente ativador de neutrófilos e fagócitos mononucleares; serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004); aumenta a permeabilidade vascular e promove a liberação do fator NF- $\kappa$ B no citosol (BURIAN; GEISLINGER, 2005; ALWANI et al., 2006).

A IL-1 $\beta$  é uma citocina que estimula a infiltração de neutrófilos, e que pode agir como mediador final ou através da indução e secreção de eicosanoides e quimiocinas (ZHANG et al., 2001). Além disso, a IL-1 $\beta$  auxilia na produção da febre (pirógeno endógeno), na liberação de proteínas da fase aguda e no aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos (DINARELLO, 1984); ela também estimula a expressão de COX-2 e, como consequência, a produção e liberação de prostanóides, os quais têm importante papel na sensibilização das fibras aferentes primárias nociceptivas e, portanto, a IL-1 $\beta$  também atua, indiretamente, como mediador hipernociceptivo (VERRI et al., 2006).

O ATFM-D inibiu significativamente a produção e/ou liberação de TNF- $\alpha$  (50 e 100 mg/kg) e IL-1 $\beta$  (100 mg/kg) no lavado da bolsa de subcutânea estéril, sugerindo que seus efeitos antiedematogênico e antinociceptivo podem estar relacionados à inibição da produção e/ou liberação destas citocinas, além de corroborar nossos

resultados dos modelos de edema de pata e da contagem de leucócitos no modelo da bolsa de ar subcutânea estéril.

A dor inflamatória resulta da ativação de células residentes, tais como os mastócitos, da infiltração de células inflamatórias, como os neutrófilos e da liberação de uma variedade de mediadores (intermediários e finais), como a bradicinina, aminas vasoativas, PGs e citocinas. Estes mediadores, que a princípio pareciam ser importantes apenas no recrutamento de neutrófilos, posteriormente, foram reconhecidos como relevantes no desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória. As citocinas são os mediadores intermediários de maior relevância no que se refere à hipernocicepção, e entre elas, destacam-se o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$  (FERREIRA et al., 2009). Os primeiros indícios de efeitos hiperalgésicos das citocinas veio de estudos usando injeções de citocinas em ratos e ambas as citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  reduziram os limiares mecânicos nociceptivos em um processo dependente de PGs (SOMMER; KRESS, 2004).

As citocinas e as quimiocinas induzem diferentes eventos relacionados à inflamação, como migração leucocitária, febre e dor. Quanto à dor inflamatória periférica, a primeira evidência da participação de uma citocina foi realizada em 1988, por Ferreira e colaboradores, que mostraram a indução de hiperalgesia mecânica em ratos pela IL-1 $\beta$  de maneira dependente da produção de PGs durante a inflamação (FERREIRA et al., 2009).

Sabe-se que após a indução de inflamação por uma endotoxina, o TNF- $\alpha$  é a primeira citocina a ser liberada, de modo que é considerada citocina-chave do processo inflamatório (CUNHA et al., 1992; ZHANG et al., 2011). Após a sua liberação, o TNF- $\alpha$  induz a secreção de IL-1 $\beta$  pelas células presentes e, conseqüentemente de PGs, elementos importantes na produção de hiperalgesia. O TNF- $\alpha$  também estimula outra via biológica dependente da liberação das quimiocinas CINC-1 (proteína quimioatraente de neutrófilos; quimiocina de ratos análoga a IL-8 em humanos), CXCL1 (quimiocina derivada de queratinócitos; quimiocina de ratos análoga a CXCL8 em humanos) ou IL-8/CXCL8, as quais são responsáveis por induzir a liberação de aminas vasoativas (CUNHA et al., 1991; VERRI et al., 2006).

A IL-1 $\beta$  é produzida e secretada sob condições patológicas que estão associadas com hiperalgesia e dor aumentadas, por exemplo, durante neuropatias, câncer ou doenças crônicas inflamatórias, como a artrite reumatoide. Sob tais condições, a IL-1 $\beta$  pode ser liberada de muitos tipos celulares, tais como células mononucleares, fibroblastos, sinoviócitos, células de Schwann e células endoteliais. Esta citocina

desempenha um papel chave na gênese da hiperalgesia mecânica e sua ação pró-nociceptiva periférica pode ser mediada por uma cascata de sinalização complexa e produção secundária de NO, bradicinina e PGs. Entretanto, a IL-1 $\beta$  também é capaz de excitar fibras nociceptivas periféricas, indicando sua ação mais direta (SOMMER; KRESS, 2004).

Sendo assim, nossos resultados sugerem que os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da partição em diclorometano podem estar relacionados à inibição da produção e/ou liberação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , assim como das respostas promovidas pela aminas vasoativas histamina e serotonina.

Os resultados obtidos neste estudo mostraram um potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de partições do extrato em metanol de folhas da *Annona tomentosa*, porém mais estudos são necessários para avaliar a toxicidade de tais partições, esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na ação de tais partições, além de identificar os compostos responsáveis por suas atividades biológicas.

## 7 CONCLUSÕES

Neste estudo demonstramos os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório das partições ATFM-H e ATFM-D em modelos de nocicepção e inflamação aguda em camundongos.

O ATFM-H mostrou efeito antinociceptivo dose-dependente no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético e efeito antinociceptivo central com envolvimento de receptores opioides  $\delta$  no seu mecanismo de ação no modelo de retirada da cauda. Além disso, o ATFM-H apresentou efeito antinociceptivo central sem promover alterações na capacidade locomotora dos animais

A partição em diclorometano apresentou efeito anti-inflamatório evidenciado pelos métodos do edema de pata induzido por carragenina, histamina e serotonina, e da bolsa de ar subcutânea estéril. O ATFM-D mostrou efeito antiedematogênico dose-dependente no edema de pata induzido pelas aminas vasoativas histamina e serotonina. Na bolsa de ar subcutânea estéril, o influxo de leucócitos para a bolsa de ar e as concentrações de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$  no lavado da bolsa foram reduzias por ação do ATFM-D, de maneira dose-dependente. Os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório do ATFM-D parecem estar relacionados à inibição da produção e/ou liberação destas citocinas, bem como às respostas desencadeadas pela histamina e serotonina.

Embora mais estudos sejam necessários para avaliar a toxicidade de tais partições, melhor esclarecer os mecanismos moleculares envolvidos na sua ação, e identificar os compostos responsáveis por tais atividades biológicas, de maneira geral, nossos resultados indicam que as partições ATFM-H e ATFM-D possuam atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

## 8. REFERÊNCIAS

- ABDOLLAHI, M.; KARIMPOUR, H.; MONSEF-ESFEHANI, H. R. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. **Pharmacological Research**, v. 48, p. 31-35, 2003.
- AKIRA, S.; UEMATSU, S.; TAKEUCHI, O. Pathogen recognition and innate immunity. **Cell**, v. 124, p. 783-801, 2006.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 171-183, 2006.
- AMANN, R.; SCHULIGOI, R.; LANZ, I.; DONNERER, J. Histamine-induced edema in the rat paw – effect of capsaicin denervation and a CGRP receptor antagonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 279, p. 227-231, 1995.
- ARDOIN, S. P.; SUNDY, J. S. Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Current Opinion in Rheumatology**, v. 18, p. 221-226, 2006.
- ARORA, N.; CAO, M.; JAVAHERI, S. Opioids, Sedatives and Sleep Hypoventilation. **Sleep Medicine Clinics**, v. 9, p. 391-398, 2014.
- BARNES, P. J. Histamine and Serotonin. **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v. 14, p. 329-339, 2001.
- BARROS, H. M.; TANNHAUSER, M. A.; TANNHAUSER, S. L.; TANNHAUSER, M. Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus. **Pharmacological Methods**, v. 26, p. 269-275, 1991.
- BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. **Dor**. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL, T. M.; SIEGELBAUM, S. A.; HUDSPETH, A. J. *Princípios de Neurociências*. 5. ed. Porto Alegre: AMGH, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Cuidados paliativos oncológicos: controle da dor**. Rio de Janeiro: INCA, 2001.
- BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 57, 2000.
- BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p. 139-154, 2005.
- CALDER, P.C.; ALBERS, R.; ANTOINE, J.-M.; BLUM, S.; BOURDET-SICARD, R.; FERNS, G. A.; FOLKERTS, G.; FRIEDMANN, P. S.; FROST, G. S.; GUARNER, F.; LOVIK, M.; MACFARLANE, S.; MEYER, P. D.; M'RABET, L.; SERAFINI, M.;

VAN EDEN, W.; VAN LOO, J.; VAS DIAS, W.; VIDRY, S.; WINKLHOFER-ROOB, B. M.; ZHAO, J. Inflammatory Disease Processes and Interactions with Nutrition. **British Journal of Nutrition**, v. 1001, p. S1-S34, 2009.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 469-484, 2015.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARBALLO et al. Antinociceptive activity of *Annona diversifolia* Saff. leaf extracts and palmitone as a bioactive compound. **Pharmacology, Biochemistry and Behaviour**, v. 95, p. 6-12, 2010.

CASHMAN, J. N. The mechanisms of action of NSAIDs in analgesia. **Drugs**, v. 52, p. 13-23, 1996.

CASTRO, A. M.; MACEDO-DE LA CONCHA, L. E.; PANTOJA-MELÉNDEZ, C. A. Low-grade inflammation and its relation to obesity and chronic degenerative diseases. **Revista Médica del Hospital General de México**, 2016.

CAVASSANI, K. A.; ISHII, M.; WEN, H.; SCHALLER, M. A.; LINCOLN, P. M.; LUKACS, N. W.; HOGABOAM, C. M.; KUNKEL, S. L. TLR3 is an endogenous sensor of tissue necrosis during acute inflammatory events. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 205, n. 11, p. 2609-2621, 2008.

CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.

CHALARIS, A.; GARBERS, C.; RABE, B.; ROSE-JOHN, S.; SCHELLER, J. The soluble Interleukin 6 receptor: Generation and role in inflammation and cancer. **European Journal**, v. 90, p. 484-494, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L. T.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 21, p. 13926-13931, 2002.

CHATROU, L. W.; PIRIE, M. D.; ERKENS, R. H. J.; COUVREUR, T. L. P.; NEUBIG, K. M.; ABBOTT, J. R.; MOLS, J. B. MAAS, J. W.; SAUNDERS, R. M. K.; CHASE, M. W. A new subfamilial and tribal classification of the pantropical flowering plant family Annonaceae informed by molecular phylogenetics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 169, p. 5-40, 2012.

CHESNOKOVA, V.; PECHNICK, R.; WAWROWSKY, K. Chronic peripheral inflammation, hippocampal neurogenesis and behavior. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 58, p. 1-8, 2016.

- CHOVATYIA, R.; MEDZHITOV, R. Stress, Inflammation and Defense of Homeostasis. **Molecular Cell**, v. 54, p. 281-288, 2014.
- CHUNG, P. C. S.; KIEFFER, B. L. Delta opioid receptors in brain function and diseases. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 140, p. 112-120, 2013.
- CLAPHAM, D. E. TRP channels as cellular sensors. **Nature**, v. 288, p. 169-170, 2003.
- CLEMENTS, P. J.; PAULUS, H. E. **Nonsteroidal antirheumatic drugs**. In: Kelley et al. *Textbook of Rheumatology*, Philadelphia: WB Saunders, p. 707-740, 1997.
- COLLIER, H. O. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.
- COSTANTINO, C. M.; GOMES, I.; STOCKTON, S.D.; LIM, M.P.; DEVI, L.A. **Opioid receptor heteromers in analgesia**. *Expert Reviews Molecular Medicine*, v. 14, 2012.
- CRAIG, C. R.; STITZEL, R. E. **Farmacologia moderna com aplicações clínicas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6. ed., 2005.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products: Secondary Metabolites**. In: Buchanan B.; Gruissem W.; Jones R. L. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Rockville: American Society of Plant Physiologists, p. 1250-1318, 2000.
- CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Immune System – Part I – Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory responses. **Brazilian Journal of Rheumatology**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. J.; FUKADA, S. Y.; GUERRERO, A. T. G.; SANTODOMINGO-GARZÓN, T.; POOLE, S.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mediate inflammatory hypernociception in mice triggered by B<sub>1</sub> but not B<sub>2</sub> kinin receptor. **European Journal of Pharmacology**, v. 573, p. 221-229, 2007.
- CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v.107, p. 660-664, 1992.
- CUNHA, F. Q.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v.104, n.3, p.765-767, 1991.
- CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v. 25, p. 243-254, 2011.
- CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 72-82, 2005.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, J. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, p. 74-79, 1941.

DAS, N.; GOSHWAMI, D.; HASAN, M. S.; MAHMUD, Z. A.; RAIHAN, S. Z.; SULTAN, M. Z. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and anxiolytic activities of methanolic extract of *Terminalia citrina* leaves. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 5, p. S137-S141, 2015.

DINARELLO, C. A. Interleukin 1 as mediator of the acute-phase response. **Survey of Immunologic Research**, v. 3, p. 29-33, 1984.

DI ROSA, M. Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89-102, 1972.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology** v. 104, p. 15-29, 1971.

DI ROSA, M.; PAPADIMITRIOU, J. M.; WILLOUGHBY, D. A. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **The Journal of Pathology**, v. 105, p. 239-256, 1971.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, p. 397-298, 1971.

DI STASI, L. C.; HIMURA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2 ed. São Paulo: Unesp, 2002.

DOS SANTOS, G. C. M.; FERNANDES, R. D.; BARROS, T. R.; ABREU, H. S.; SUZART, L. R.; DE CARVALHO, M. G.; BRAZ FILHO, R.; MARINHO, B. G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract from the stem bark of *Lophantera lactescens*. **Planta Médica**, v. 81, n. 18, p. 1688-1696, 2015.

DUARTE, D.B.; VASKO, M.R.; FEHRENBACHER, J.C. Models of inflammation: carrageenan air pouch. **Current Protocols in Pharmacology**, v. 56, p. 561-568, 2012.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FEIN, A. **Nociceptores – As células que sentem dor**. Ribeirão Preto, 2011

FENG, Y.; HE, X.; YANG, Y.; CHAO, D.; LAZARUS, L. H.; XIA, Y. Current Research on Opioid Receptor Function. **Current Drug Targets**, v. 13, p. 230-246, 2012.

FERREIRA, S. H. et al. **Dor Inflamatória**. In: ONOFRE ALVES NETO e colaboradores. *Dor: Princípios e Prática*. 1. ed. Porto Alegre: AMGH, 2009.

FERREIRA, S. H.; DUARTE, I. D.; LORENZETTI, B. B. The molecular mechanism of action of peripheral morphine analgesia: stimulation of the cGMP system via nitric oxide release. **European Journal of Pharmacology**, v. 201, p. 121-122, 1991.

FERREIRA, S. H. **Oedema and increased vascular permeability**. In: Vane, J. R.; Van Arman, C. G., editors. *Handbook of experimental pharmacology*. New York: 7 Springer-Verlag, p. 75-91. 1979.

FISCHER, L. G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL, V. F.; SOUZA, M. M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 32, p. 235-239, 2008.

FITZGERALD, G. A. COX-2 and beyond; approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 2, p. 879-880, 2003.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in Inflammation. **Current Drugs Targets**, v. 4, p. 281-286, 2005.

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, p. 1871-1875, 2001.

GAVERIAUX-RUFF C.; KARCHEWSKI, L. A.; HEVER, X.; MATIFAS, A.; KIEFFER, B. L. Inflammatory pain is enhanced in delta opioid receptor-knockout mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 27, p. 2558–2567, 2008.

GAWADE, S. P. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of Pharmacology & Pharmacotherapeutics**, v. 3, p. 348, 2012.

GONÇALVES, G. M.; CAPIM, S. L.; VASCONCELLOS, M. L. A. A.; MARINHO, B. G. Antihyperalgesic effect of [(±)-(2,4,6-cis)-4-chloro-6-(naphthalen-1-yl)-tetrahydro-2H-pyran-2-yl]methanol: participation of the NO/cGMP/K<sub>ATP</sub> pathway and κ-opioid receptor. **Behavioural Pharmacology**, v. 27, n. 6, p. 505-515, 2016.

GOTTSBERGER, G. As anonáceas do Cerrado e sua polinização. **Revista Brasileira de Biologia**, v. 54, n. 3, p. 391-402, 1994.

GROSSER, T.; SMYTH, M.; FITZGERALD, G. A. **Agentes anti-inflamatórios, antipiréticos e analgésicos; farmacoterapia da gota**. In: BRUNTON, L. L.; CHARBNER, B. A. KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12. ed. Porto Alegre, AMGH, 2012.

HENDERSON, W. R. The Role of Leukotrienes in Inflammation. **Annals of Internal Medicine**, v. 121, p. 684-697, 1994.

HENRY, D.; LIM, L. L. Y.; GARCÍA-RODRIGUES, L. A.; PEREZ GUTTHANN, S.; CARSON, J. L.; GRIFFIN, M.; SAVAGE, R.; LOGAN, R.; MORIDE, Y.; HAWKEY, S.; HILL, S.; FRIES, T. J. Variability in risk of gastrointestinal complications with individual non-steroidal anti-inflammatory drugs: results of a collaborative meta-analysis. **British Medicine Journal**, v. 312, p. 1563 – 1566, 1996.

HOSKIN, P. J.; HANKS, G. W. Opioid agonist-antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, v. 41, p. 326 – 344, 1991.

IASP – INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR STUDY OF PAIN. **Guia para o Tratamento da Dor em Contextos de Poucos Recursos**. Seattle: IASP Press, 2010.

IASP – INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR STUDY OF PAIN. **IASP Taxonomy**, 2012. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy>>. Acesso em: 13 de jan. 2017.

JAGADISH, P. C.; LATHA, K. P.; MUDGAL, J.; NAMPURATH, G. K. Extraction, characterization and evaluation of *Kaempferia galangal* L. (Zingiberaceae) rhizome extracts against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 434-439, 2016.

JAIN, M.; PARMAR, H.S. Evaluation of antioxidative and anti-inflammatory potential of hesperidin and naringin on the rat air pouch model of inflammation. **Inflammation Research**, v.60, p. 483-491, 2011.

JANSSEN P. A. J.; NIEMEGEREERS, C. J. E.; DONY, J. G. H. The inhibitory effect of fentanyl and morphine-like analgesics on the warm water-induced tail withdrawal reflex in rats. **Arzneimittelforschung**, v. 13, p. 502-507, 1963.

JIA, R.; LI, Q.; SHEN, W.; ZHANG, J.; ZHENG, L.; WANG, G. Antinociceptive activity of a polysaccharide from the roots of *Sophora flavescens*. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 93, p. 501-505, 2016.

JONES, P. G.; DUNLOP, J. Targeting the cholinergic system as a therapeutic strategy for the treatment of pain. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 197-206, 2007.

JOTHY, S. L.; AZIZ, A.; CHEN, Y.; SASIDHARAN, S. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of *Polyalthia longifolia* and *Cassia spectabilis* leaves against paracetamol-induced liver injury. **Evidenced-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-10, 2012.

KATZ, W. A.; ROTHENBERG, R. The Nature of Pain: Pathophysiology. **Journal of Clinical Rheumatology**, v. 11, n. 2, p. 11-15, 2005.

KHANAPURE, S. P.; GARVEY, D. S.; JANERO, D. R.; LETTS, L. G. Eicosanoids in Inflammation: Biosynthesis, Pharmacology, and Therapeutic Frontiers. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, p. 311-340, 2007.

KOSTER R, ANDERSON M, DE BEER EJ. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation and Disease Susceptibility. **Cell**, v., 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran: Patologia – Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins: Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 928 p., 2013.

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

LAMPINEN, M.; CARLSON, M.; HAKANSSON, L. D.; VENGE, P. Cytokine-regulated accumulation of eosinophils in inflammatory disease. **Allergy**, v. 59, p. 793-805, 2004.

LAPA, A. J. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais**. 5. ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2007.sbed

LEVY, L. Carrageenan paw edema in the mouse. **Life Sciences**, v. 8, n. 11, p. 601-606, 1969.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARG, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature**, v. 7, p. 678-689, 2007.

LOESER, J. D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, p. 1607-1609, 1999.

LOHMANN, A. B.; WELCH, S. P. ATP-gated K<sup>+</sup> channel openers enhance opioid antinociception: indirect evidence for the release of endogenous opioid peptides. **European Journal of Pharmacology**, v. 385, p. 119-127, 1999.

MAAS, P.; LOBÃO, A.; RAINER, H. Annonaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2015. Disponível: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB117276>>. Acesso em: 13 de jan. 2017.

MARTINS, R. T.; ALMEIDA, D. B.; MONTEIRO, F. M. R.; KOWACS, P. A.; RAMINA, R. Opioid receptors to date. **Revista Dor**, v. 13, p. 75-79, 2012.

MAZAK, K.; HOSZTAFI, S.; RACZ, A.; NOSZAL, B. Structural and physicochemical profiling of morphine and related compounds of therapeutic interest. **Mini reviews in Medicinal Chemistry**, v.9, p. 984-995, 2009.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MELLO- SILVA, R.; PIRANI, J. R. Flora de Grão-Mogol, Minas Gerais: Annonaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 21, n.1, p. 67-72, 2003.

MELLO- SILVA, R.; LOPES, J. C.; PIRANI, J. R. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Annonaceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 30, n.1, p. 37-57, 2012.

MENDONÇA-FILHO, R. R. Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Alemanha: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.

MILLAN, M. J. Descending of control pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

- MILANO, J.; OLIVEIRA, S. M.; ROSSATO, M. F.; SAUZEM, P. D.; MACHADO, P.; BECK, P.; ZANATTA, N.; MARTINS, M. A.; MELLO, C. F.; RUBIN, M. A.; FERREIRA, J.; BONACORSO, H. G.; Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalina and hot-plate tests in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 581, p. 86–96, 2008.
- MONCADA, A.; CENDAN, C. M.; BAEYENS, J. M.; DEL POZO, E. Effects of serine/threonine protein phosphatase inhibitors on morphine-induced antinociception in the tail flick test in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 465, p. 53-60, 2003.
- MONIRUZZAMAN, M.; FERDOUS, A.; BOKUL, F. W. Evaluation of antinociceptive activity of ethanol extract of bark of *Polyalthia longifolia*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 172, p. 364-367, 2015.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115-121, 2003.
- MULLER, W. A. Leukocyte – endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. **Trends in Immunology**, v. 24, n. 6, 2003.
- NADAL, X.; BAÑOS, J. E.; KIEFFER; B. L.; MALDONADO, R. Neuropathic pain is enhanced in delta-opioid receptor *knockout* mice. **European Journal of Neuroscience**, v. 23, p. 830-834, 2006.
- NAPOLI, C.; PAOLISSO, G.; CASAMASSIMI, A.; AL-OMRAN, M.; BARBIERI, M. SOMMESE, L.; INFANTE, T.; IGNARRO, L. J. Effects of nitric oxide on cell proliferation. **Journal of American College of Cardiology**, v. 62, n. 2, p. 89-95-2013.
- NASS, F. R.; SKARE, T. L.; GOELDNER, I.; NISIHARA, R.; MESSIAS-REASON, I. T.; UTIYAMA, S. R. R. Análise de quarto marcadores sorológicos na artrite reumatoide: associação com manifestações extra-articulares no paciente e artralgia em familiares. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 57, p. 286-293, 2017.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.
- NGUELEFACK, T. B.; FOTIO, A. L.; WATCHO, P.; WANSI, S. L.; DIMO, T.; KAMANYI, A. Analgesic properties of the aqueous and ethanol extracts of the leaves of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae). **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 385-388, 2004.
- OCAÑA, M.; CENDÁN, C. N.; COBOS, E. J.; ENTRENA, J. M.; BAYENS, J. M. Potassium channels and pain: presente realities and futures oportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203-219, 2004.
- OLIVEIRA, F. S.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 588-591, 2008.
- OLIVEIRA JÚNIOR, J. O.; SERRANO, S. C.; TEODORO, A. L.; DANA, B. A. Os antiinflamatórios não hormonais. **Prática Hospitalar**, v. 51, p. 173-178, 2007.

- OTUKI, M. F.; FERREIRA, J.; LIMA, F. V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L. A.; CANI, G. S.; SANTOS, A. R.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 313, n. 1, p. 310-318, 2005.
- PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V. F. C.; SOARES, P. M. G.; RIBEIRO, R. A.; ARAGÃO, K. S.; MARINHO, M. M.; SILVA, M. T. L.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. S. A novel *N*-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**, v. 65, p. 43-52, 2016.
- PRADHAN, A. A.; BEFORT, K.; NOZAKI, C.; GAVERIAUX-RUFF, C.; KIEFFER, B. L. The delta opioid receptor: an evolving target for the treatment of brain disorders. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 581-590, 2011.
- PORTO, C. C. **Exame Clínico: Bases para a prática médica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p. 331-338, 2004.
- RACKÉ, K.; SCHWORER, H. Regulation of serotonin release from the intestinal mucosa. **Pharmacological Research**, v. 23, p. 13-25, 1991.
- RAHBARDAR, M. G.; AMIN, B.; MEHRI, S.; MIRNAJAFI-ZADEH, S. J.; HOSSEINZADEH, H. Anti-inflammatory effects of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. and rosmarinic acid in a rat model of neuropathic pain. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 86, p. 441-449, 2017.
- RAMANA KV, TAMMALI R, REDDY ABM, BHATNAGAR A, SRIVASTAVA SK. **Aldose Reductase-Regulated Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Production Is Essential for High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth**. *Endocrinology*. 148, n. 9, 4371-4384. 2007.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier, 7. ed., 2011.
- RINALDI, M. V. N. **Avaliação da atividade antibacteriana e citotóxica dos alcaloides isoquinolínicos de *Annona hypoglauca*** Mart. 2007. 125 f. Dissertação (Mestrado em FÁRMACOS E MEDICAMENTOS) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.
- ROCK, K. L.; KONO, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **The Annual Review of Pathology: Mechanism of Disease**, v. 3, p. 99-126, 2008.
- RUIZ, S. E. MORETT, A. L. Las Anonas en el México Prehispánico. Chapingo, Edo. de México. **Memorias Congreso Internacional de Anonáceas**. México, 1997.
- SANTOS, D. Y. A. C.; SALATINO, M. L. F. Foliar flavonoids of Annonaceae from Brazil: taxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 55, p. 567-573, 2000.

SARAIVA, J. F. K. COX-2 Risco cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente? **Phaenix Comunicação Integrada**, p. 1-5, 2007.

SAVITHRAMMA, N.; RAO, M. L.; SUHRULATHA, D. Screening of Medicinal Plants for Secondary Metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, p. 579-584, 2011.

SBED – Sociedade Brasileira para Estudo da Dor. **Classificação**. Disponível em: <[http://www.sbed.org.br/lermais\\_materias.php?cd\\_materias=172&friurl=\\_-Classificacao-\\_-](http://www.sbed.org.br/lermais_materias.php?cd_materias=172&friurl=_-Classificacao-_-)>. Acesso em: 15 de jan. 2017.

SCHAIBLE, H.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbeck's Archives of Surgery**, v. 389, p. 237-243, 2004.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. **Annual Review Biomedical Engineering**, vol. 8, p. 93-131, 2006.

SCHWAB, J. M.; BEITER, T.; LINDER, J. U.; LAUFER, S.; SCHULZ, J. E.; MEYERMANN, R.; SCHLUESENER, H. J. COX-3 – A virtual pain target in humans? **The FASEB Journal**, v. 13, p. 2174-2175, 2003.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v. 18, p. 439-446, 1986.

SHELGER, S. I. **General characteristics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs**. In: Paulus, H. E.; Furst, D. E.; Dromgoole, S. H. *Drugs for rheumatic disease*. New York: Churchill: Livingstone, p. 203, 1987.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SINDRUP, S. H.; JENSEN, T. S. Efficacy of pharmacological treatments of neuropathic pain: an update and effect related to mechanism of drug action. **Pain**, v. 83, p. 389 – 400, 1999.

SIQUEIRA, J. T. T. SBED – Sociedade Brasileira para Estudo da Dor. **Porque a Dor é uma questão também de Saúde Pública!** Disponível em: <[http://www.sbed.org.br/materias.php?cd\\_secao=74](http://www.sbed.org.br/materias.php?cd_secao=74)>. Acesso em: 15 de jan. 2017.

SOJA, P. J.; TAEPAVARAPRUK, N.; PANG, W.; CAIRNS, B. E.; MCERLANE, S. A.; FRAGOSO, M. C. Transmission through the dorsal spinocerebellar and spinoreticular tracts: wakefulness versus thiopental anesthesia. **Anesthesiology**, v. 97, n. 5, p. 1178-88, 2002.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184-187, 2004.

SOUSA, O. V. **Atividades farmacológicas de produtos obtidos de *Duguetia lanceolata* e *Annona coriacea* - Annonaceae**. 2003. 143 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal) Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2003.

- SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; KAPLAN, M. A. C. Propriedades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico de folhas de *Annona coriácea* Mart. (Annonaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 26, n. 6, p. 872-877, 2007.
- STEIN, C.; CLARK, J. D.; VASKO, M. R.; WILCOX, G. L.; OVERLAND, A. C.; VANDERAH, T. W.; SPENCER, R. H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Research Reviews**, v. 60, p. 90-113, 2009.
- TABARELLI, Z.; BERLESE, D. B.; SAUZEM, P. D.; RUBIN, M. A.; MISSIO, T. P.; TEIXEIRA, M. V.; SINHORIN, A. P.; MARTINS, M. A. P.; ZANATTA, N.; BONACORSO, H. G.; MELLO, C. F. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, n.10 p. 1531-1540, 2004.
- TAKEUCHI, O.; AKIRA, S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. **Cell**, v. 140, p. 805-820, 2010.
- TEIXEIRA, M. J. **Fisiopatologia da Dor**. In: ONOFRE ALVES NETO e colaboradores. *Dor: Princípios e Prática*. 1. ed. Porto Alegre: AMGH, 2009, p. 265-279.
- THOMSON, L.; RAIT, K.; MILLER, L. Opioids in the management of the persistente non-cancer pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine**, v. 17, p. 552-554, 2016.
- VALLI, M.; DOS SANTOS, R. N.; FIGUEIRA, L. D.; NAKAJIMA, C. H.; CASTRO-GAMBOA, I.; ANDRICOPULO, A.D.; BOLZANI, V. S. Development of a Natural Products Database from the Biodiversity of Brazil. **Journal of Natural Products**, v. 73, p. 439-444, 2013.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory? **Brain Research Reviews**, v. 46, p.295-309, 2004.
- VANNINI, F.; KASHFI, K.; NATH, N. The dual role of iNOS in cancer. **Redox Biology**, v. 6, p. 334-343, 2015.
- VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.
- VIGIL, S. V.; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T.S. Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch. **Transplant Immunology**, v. 19, p. 25-29, 2008.
- VONGTAU, H. O.; ABBAH, J.; NGAZAL, I. E.; KUNLE, O. F.; CHINDO, B. A.; OTSAPA, P. B.; GAMANIEL, K. S. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of the methanolic extract of Parinari polyandra stem bark in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, p. 115-121, 2004.
- WEIER, M. R. Renal effects of nonselective NSAIDs and coxibs. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, v. 69, p. SI-53-SI-58, 2002.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory processes. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, p. 378-381, 1999.

WILLER, J. C.; BOUHASSIRA, D.; LE BARS, D. Neurophysiological bases of the counterirritation phenomenon: diffuse control inhibitors induced by nociceptive stimulation. **Clinical Neurophysiology**, v. 29, p. 379-400, 1999.

WILLIAMS, A. C. C.; CRAIG, K. D. Updating the definition of pain. **Pain**, v. 157, p. 2420-2423, 2016.

WILLOUGHBY, D. A. In vivo models of inflammation. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 109-113, 2003.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p.544-47, 1962.

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

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal Plasticity. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality controls methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants**. Geneva, v. 1, 2003.

YARKSH, T. L.; WALLACE, M. S. **Opioides, analgesia e tratamento da dor**. In: BRUNTON, L. L.; CHARBNER, B. A. KNOLLMANN, B. C. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman*. 12. ed. Porto Alegre, AMGH, 2012.

YI, T.; LO, H.; ZHAO, Z.; YU, Z.; YANG, Z.; CHEN, H. Comparison of the chemical composition and pharmacological effects of the aqueous and ethanolic extracts from a Tibetan "Snow Lotus" (*Saussurea laniceps*) herb. **Molecules**, v. 17, 7183-7194, 2012.

ZAKARIA, Z. A.; SANI, M. H. M.; KADIR, A. A.; KEK, T. L.; SALLEH, M. Z. Antinociceptive effect of semi-purified petroleum ether partition of *Muntingia calabura* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. xxx, p. xxx-xxx, 2016.

ZHANG, J.; AN, J. Cytokines, Inflammation and Pain. **International Anesthesiology Clinical**, v. 45, p. 27-37, 2007.

ZHANG, L.; BERTA, T.; XU, Z.; LIU, T.; PARK, J. Y.; JI, R. TNF-alpha contributes to spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain: Distinct role of TNF receptor subtypes 1 and 2. **Pain**, v. 152, p. 419-427, 2011.

ZHANG, L.; HU, J. J.; LIN, J. W.; FANG, W. S.; DU, G. H. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of *Pterocephalus hookeri* (C. B. Clarke) Höeck. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 510-514, 2009.

ZHANG, X. W.; LIU, Q.; WANG, Y.; THORLACIUS, H. CXC chemokines, MIP-2 and KC, induce P-selectin-dependent neutrophil rolling and extravascular migration *in vivo*. **British Journal of Pharmacology**, v. 133, p. 413-421, 2001.

