

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

AMANDA ALVARENGA DE SOUZA

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE
DILLENIA INDICA LINN.**

Alfenas/MG

2018

AMANDA ALVARENGA DE SOUZA

**ESTUDO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E
DO PERFIL QUÍMICO DO EXTRATO E FRAÇÕES DOS FRUTOS DE
DILLENIA INDICA LINN.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Química Orgânica.

Orientador: Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior.

Co-orientadores: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva e Dr^a. Fabiana Cardoso Vilela

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Souza, Amanda Alvarenga de.
S729e Estudo do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e do perfil químico do extrato e frações dos frutos de *Dillenia indica* Linn. / Amanda Alvarenga de Souza. – Alfenas/MG, 2018.
72 f.: il --

Orientador: Cláudio Viegas Júnior.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2018.
Bibliografia.

1. Dileniaceae. 2. Analgesicos. 3. Antioxidante. 4. Canabinóides.
5. Analgesia. I. Viegas Júnior, Cláudio. II. Título.

CDD-547

Amanda Alvarenga de Souza

“Estudo do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e do perfil químico do extrato e frações dos frutos de *Dillenia indica* Linn”


A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química Orgânica.

Aprovado em: 27, 02, 2018

Prof. Dr. Cláudio Viegas Júnior
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Vanessa Bergamin Boralli Marques
Instituição: Universidade Federal de Alfenas -
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Luciana de Ávila Santos

Assinatura:  _____

Dedico este trabalho a todos que sempre estiveram ao meu lado, me acompanhando, apoiando e principalmente acreditando em mim. Em especial a Vó Dora (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Durante esses dois anos de mestrado, algumas pessoas me acompanharam e foram fundamentais para a conquista de mais essa etapa. Neste momento, expresso um pouco da importância que elas tiveram nesta conquista além de minha gratidão a todas.

Aos meus pais, Rosemeire e Celso, pelo apoio, incentivo e por aceitarem que eu sempre siga os meus sonhos. À minha irmã Carolina, quem escutou muitas reclamações e foi responsável por nunca me deixar desistir. Obrigada pelos valores que sempre vou levar comigo.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Claudio Viegas Jr., por me confiar este trabalho e dedicar parte do seu tempo me orientando. Por acreditar em mim e sempre me fazer enxergar que sou capaz. Agradeço também pelas críticas construtivas que me fizeram crescer cada dia mais e é por conta disso que isto tudo aconteceu.

Aos colegas e amigos do PeQuiM pelo companheirismo e aprendizado dividido durante estes anos. À pós-doutoranda Vanessa Gontijo pela ajuda no experimento da atividade sequestrante de DPPH. Ao doutorando Matheus Freitas pelos conselhos, puxões de orelha e por toda ajuda oferecida. À Flávia Viegas pela companhia na descoberta de novos metabólitos. As demais doutora e doutoranda Kris Simone e Cindy Cristancho. A aluna de mestrado Graziella. Aos alunos de iniciação científica Ariele Faria, Letícia Coelho, Suellen Faria, Izabelle Lopes, Mayara Chagas e Júlia Schulz. Um agradecimento especial às mestres Sarah Vaz, Carla Oliveira e Nathália Mariano as quais foram essenciais para o fim deste trabalho; onde fizeram os dias serem mais alegres e a rotina do laboratório mais leve. Obrigada “Kátia’s”.

À minha coorientadora Dr^a Fabiana Vilela Cardoso Giusti que é a responsável pelo meu conhecimento de fisiologia, pela realização dos experimentos farmacológicos, pela atenção, paciência e disposição em me ajudar em todos os momentos. A doutoranda Jádina Vieira Dias pela amizade, paciência e dedicação com esse trabalho. Ao Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva e aos demais colegas e técnicos do Laboratório de Fisiologia Translacional.

Ao meu coorientador Prof Dr. Geraldo Alves da Silva pelo suporte.

Aos colaboradores da Universidade de São Paulo – Ribeirão Preto, Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pela ajuda e disponibilidade na realização dos experimentos de

perfil químico. Ao seu aluno de Doutorado Juliano Geraldo Amaral pela ajuda e paciência e pelo técnico responsável pelo laboratório José Carlos Tomaz pelas análises realizadas.

Aos amigos de longa data, que viram a realização deste sonho do começo ao fim.

À UNIFAL-MG e ao Programa de Pós-Graduação em Química (PPGQ) pela oportunidade. À CAPES, CNPq, FINEP, FAPEMIG e INCT-INOVAR pelo suporte financeiro e pela bolsa que possibilitaram a realização deste trabalho.

RESUMO

Dillenia indica é uma árvore classificada como medicinal, pertencente à família Dilleniaceae, também conhecida como maçã-de-elefante ou flor-de-abril. As folhas, a casca, o caule e os frutos da planta são usados na medicina tradicional como bebida para o tratamento de febre e tosse, além da infusão que é utilizada topicamente nas articulações para o tratamento de dores e inflamações. Neste trabalho, o extrato bruto dos frutos de *D. indica* e suas frações hidroalcoólica, hexânica e acetato de etila foram estudadas química e farmacologicamente, a fim de validar seu uso popular. Os resultados obtidos confirmaram a atividade antinociceptiva tanto do extrato bruto dos frutos, como de suas frações, no modelo de nocicepção induzida por formalina. A administração do antagonista do receptor de opioide, o naloxano, inibiu o efeito antinociceptivo do extrato bruto na primeira fase do teste de formalina, sugerindo seu efeito sobre receptores opioides. Além disso, o pré-tratamento com AM251, um antagonista de receptor canabinoide CB1, inibiu a atividade antinociceptiva induzida pelo extrato bruto e quase todas as frações testadas na primeira e segunda fases do teste de formalina, sugerindo também o envolvimento de receptores canabinoides. O estudo químico de desrepliação por CLAE-MS-MS, com auxílio da plataforma GNPS (*Global Natural Product Social Molecular Networking*) levou à identificação de vários constituintes químicos conhecidos no extrato e frações, incluindo flavonoides como ácido cafeoilílico, naringenina, quercetina, caempferol, dentre outros, cujos dados da literatura corroboram os resultados observados de moderada atividade antioxidante do extrato e suas frações, bem como sua ação analgésica e anti-inflamatória. Portanto, tanto o extrato bruto, como suas frações de *Dillenia indica* é constituído por compostos flavonoides, que devem ser responsáveis pela ação antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória, que é mediada pelos sistemas opioide e canabinoide em camundongos. As frações também apresentam flavonoides em sua constituição, que podem ser responsáveis pelas atividades analgésica, anti-inflamatórias e antioxidante observadas, cuja atividade antinociceptiva parece ser mediada pelo sistema canabinoide. Estes resultados indicam que *Dillenia indica* pode ser útil ao tratamento e alívio da dor, confirmando seu uso tradicional como analgésico.

Palavras chaves: *Dillenia indica* Linn. Efeito analgésico. Atividade antioxidante. Atividade antinociceptiva. Opioide. Canabinoide. Analgesia.

ABSTRACT

Dillenia indica is a tree classified as medicinal plant, belonging to the family Dilleniaceae, which may also be known as elephant-apple or April-flower. The leaves, bark, stem and fruits of this plant are used in traditional medicine as a drink for the treatment of fever and cough, and an effusion is used topically in the joints for the treatment of pain and inflammation. In this work, the crude extract and its hydroalcoholic, hexane and ethyl acetate fractions were studied chemically and pharmacologically, in order to validate the popular use of this plant. The results confirmed the antinociceptive activity of the crude extract and its fractions of the fruits of *D. indica* observed in the formalin-induced nociception model. The administration of naloxone, an opioid receptor antagonist, inhibited the antinociceptive effect of the crude extract in the first phase of the formalin test, suggesting an effect on the opioid receptor. In addition, pretreatment with AM251, a CB1 receptor antagonist, inhibited the antinociceptive activity of the crude extract and almost all its fractions tested in the first and second phases of the formalin test, suggesting also de involvement of cannabinoid system. The chemical dereplication study by HPLC-MS-MS, supported by the GNPS platform (*Global Natural Products System*) led to the identification of a number of known chemical constituents in the crude extract and fractions, including flavonoids such as caffeoylmalic acid, naringenin, quercetin, caempferol, among others, which literature data corroborate the observed moderate activity, along with anti-inflammatory and analgesic activities. Therefore, the crude extract of *Dillenia indica* and its fractions are also constituted by flavonoids, that could be responsible by the antioxidant, in addition to the anti-inflammatory and antinociceptive activities mediated by both opioid and cannabinoid systems in mice. The fractions also showed flavonoids as constituents, that could be responsible by the antioxidant activity, and involvement of cannabinoid system in the modulation of the observed anti-inflammatory and antinociceptive activities. These results indicate that *Dillenia indica* could be useful in the treatment and relief of pain, confirming its traditional use as analgesic.

Keywords: *Dillenia indica* Linn. Analgesic effect. Opioid. Cannabinoid. Antioxidant activity. Antinociceptive activity. Analgesy.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Desenho esquemático de um nociceptor.....	17
Figura 2 -	Via ascendente da dor.....	18
Figura 3 -	Estruturas químicas da morfina (1), diidrocodeína (2) e codeína (3)	19
Figura 4 -	Representação caricaturada dos sinais cardinais do processo de inflamação.....	21
Figura 5 -	Representação das fases de instalação e progressão do processo inflamatório	22
Figura 6 -	Estruturas químicas da Aspirina (4), ibuprofeno (5), piroxicam (6) e diclofenaco (7)	24
Figura 7 -	<i>Dillenia indica</i> Linn. (A) árvore, (B) tronco, (C) fruto (D) folhas.....	25
Figura 8 -	Estruturas químicas do ácido betulínico (8), aldeído betúlico (9), ramnetina (10), lupeol (11), miricitina (12), naringerina (13), quercetina (14), campfenol (15) e estigmasterol (16), metabólitos isolados de diversas partes de <i>D. indica</i>	27
Figura 9 -	Estruturas químicas do colesterol (17) e ácido glutâmico (18) isolados das folhas de <i>D. indica</i>	28
Figura 10 -	Estrutura do radical DPPH e de sua hidrazina correspondente.....	38
Figura 11 -	Efeito do extrato bruto de <i>Dillenia indica</i> L. administrado via oral em camundongos Swiss sobre o tempo de lambida no teste formalina. Os animais foram tratados oralmente com o veículo, EB (doses 30, 100 e 300 mg/kg), indometacina (Indo: 10 mg/kg) ou morfina (Morp; 3mg/kg). Cada coluna representa a média com S.E.M. para doze camundongos cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância (One Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls): *** p < 0,001 quando comparado com o grupo controle (veículo)	41
Figura 13 -	Efeito das frações de <i>Dillenia indica</i> L. administrado via oral em camundongos Swiss sobre o tempo de lambida na segunda fase no teste formalina. Os animais foram tratados oralmente com o veículo, 3 frações (doses 3, 10 e 30 mg/kg), indometacina (Indo: 10 mg/kg), morfina (Morp; 3mg/kg). Cada coluna representa a média com S.E.M. para oito	

	camundongos em cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância (One Way ANOVA seguido do pós-teste de Newman-Keuls): *** p < 0,001, ** p < 0,01, * p < 0,1 quando comparado com o grupo controle (veículo)	42
Figura 14 -	Gráfico de distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s)	43
Figura 15 -	Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de opióides não seletivo naloxano (1 mg / kg; i.p.) ou antagonista do receptor CB1 AM251 (3 mg / kg; i.p.) administrado 15 min antes dos tratamentos com extrato bruto (30 mg / kg, p.o.), as frações de acetato de etila (FAE), hidroalcoólica (FHA) e hexânica (FHE) (3 mg / kg, p.o.) na primeira (Figura 15A) e segunda fase (Figura 15B) do teste de formalina. Cada coluna representa a média com S.E.M. por sete a nove ratos em cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância: * p <0,05, ** p <0,01 e *** p <0,001 quando comparados com o grupo controle (veículo); #p <0,05, ## p <0,01 e ### p <0,001 quando comparado ao respectivo grupo pré-tratado com o veículo.....	45
Figura 16 -	Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo do Extrato Bruto de <i>Dillenia indica</i> Lin.....	48
Figura 17 -	Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo da fração hidroalcoólica.....	50
Figura 18 -	Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo da fração AcOEt....	52
Figura 19 -	Espectros de MS, MSMS e UV do flavonoide Quercetina-3-O-glucuronido.....	54
Figura 20 -	Espectros de MS, MSMS e UV do flavonoide Isoramnetin-3-O-glucósido.....	54
Figura 21 -	Estrutura dos metabólitos identificados por CLAE-MSMS. Ácido protocatecuíco-4-glucósido (20), ácido rosmárico (21), ácido caprílico (22), ácido octodecanóico (23), isoramnetina ramnose (24), diosmetin-6-C-hexose (25), caempfenol-3-O-acetil hexose (26), ácido glucônico (27)..	55
Figura 22 -	Estrutura dos metabólitos identificados por CLAE-MSMS. Estrutura dos metabólitos identificados por CLAE-MSMS. Quercetina-3-O-glucuronido (28), isoramnetin-3-O-glucósido (29), caempfenol-3-O-	

	hexose (30), caempfenol-3-O-glucuronido (31), naringenina (32), ácido protocatecuíco-O-hexose (33), ácido cafeoil-5-O-quínico (34).....	56
Figura 23 -	Estrutura química geral de um flavonoide.....	57
Figura 24 -	Estrutura química das chalconas (36), flavanonas (37), flavanonóis (38), flavonas (39), flavonóis (40), isoflavonas (41), flavan-3-ols (42) e antocianidinas (43)	58
Figura 25 -	Estrutura do ácido cafeoilmálico.....	59
Figura 26 -	Rede Molecular formada pelo software GNPS.....	60
Figura 27 -	Principal cluster da rede molecular retirado da Figura 22.....	61
Figura 28 -	Atividade antioxidante do extrato bruto e frações pelo teste de Sequestro de Radical DPPH.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Resultados ensaio de toxicidade.....	45
Tabela 2 -	Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EMEM no extrato bruto dos frutos de <i>Dillenia indica</i> Lin.....	47
Tabela 3 -	Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EMEM na fração hidroalcoólica dos frutos de <i>Dillenia indica</i> Lin.....	49
Tabela 4 -	Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EMEM na fração acetato de etila dos frutos de <i>Dillenia indica</i> Lin.....	51
Tabela 5 -	Grupos e suas cores resultantes da análise por GNPS.....	58

LISTA DE ABREVIACOES, SIGLAS E SÍMBOLOS

AC	- Fração acetato de etila
AINEs	- Anti-inflamatórios não esteroidais
BPC	- Cromatograma de pico base
CLAE-DAD	- Cromatografia líquida de alta eficiência com detector <i>Diode Array</i>
Cols	- Colaboradores
COX	- Cicloxigenase
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrihidrazila
GNPS	- Global Natural Product Social Molecular Network
HA	- Fração hidroalcoólica
Hex	- Fração hexânica
CLAE-MS	- Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada  Espectroscopia de Massas
i.p.	- Intraperitoneal
Indo	- Indometacina
Morf	- Morfina
OMS	- Organização mundial de saúde
SNC	- Sistema nervoso central
UV/ <i>vis</i>	- Espectroscopia no ultravioleta visível
v.o.	- Via oral
Vec.	- Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA	16
2.1	DOR	16
2.2	PROCESSO INFLAMATÓRIO	20
2.3	<i>DILLENIA INDICA</i> LINNAEUS	24
3	JUSTIFICATIVA	31
4	OBJETIVOS.....	32
4.1	OBJETIVOS GERAIS	32
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
5	PARTE EXPERIMENTAL	33
5.1	MÉTODO DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS	33
5.2	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	33
5.2.1	Animais	33
5.2.2	Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina	34
5.2.3	Ensaio de Campo Aberto	34
5.3.4	Avaliação do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo	35
5.3.5	Ensaio de toxicidade aguda	35
5.3.6	Análise estatística	36
5.4	ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS SEQUENCIAL (CLAE-DAD-EMEM).....	36
5.5	AVALIAÇÃO DO PODER SEQUESTRANTE DE RADICAIS DPPH.....	38
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	40
6.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA <i>IN VIVO</i> E ANTIOXIDANTE	40
6.1.1	Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina	40

6.1.2 Campo Aberto	43
6.1.3 Avaliação do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo	44
6.1.4 Ensaio de toxicidade aguda	47
6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	47
6.2.1 Atividade Sequestrante de DPPH	48
6.3 PERFIL QUÍMICO: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO POR IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS PICOS CROMATOGRÁFICO	49
7 CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) as principais causas de morte em 2015 foram doenças cardíacas, pulmonares, câncer, AIDS, diabetes, entre outras (WHO, 2015). A maioria destas doenças tem em comum a presença da inflamação e da dor como parte dos processos de instalação e progressão (HENSCHKE; KAMPER; MAHER, 2015). A dor está presente na vida de milhares de pessoas, porém uma quantidade muito restrita de fármacos está disponível para seu tratamento, pois a dor possui uma fisiologia complexa. Atualmente, a terapêutica da dor é baseada no uso de fármacos antiepilépticos, analgésicos opioides, antidepressivos e lidocaína tópica, porém com efeitos colaterais diversos, além de eficiência muito variável (LI, 2017).

No contexto da inflamação, a terapêutica atual é rica em alternativas medicamentosas, incluindo fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais de diversas classes químicas. Entretanto, as manifestações inflamatórias apresentam um componente individual muito particular, responsável pela intolerância em vários pacientes, falta de eficácia e manifestações adversas de amplo espectro. Além disso, doenças multifatoriais como o câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes, arteriosclerose, dentre outras, tem em comum a presença da inflamação nos processos de instalação, progressão e severidade das doenças. Não são incomuns os casos que exigem o tratamento adjuvante de inúmeras patologias, sejam de origem traumática, infecciosas, autoimune, com o uso de medicamentos anti-inflamatórios de curta ou longa duração. Portanto, a busca por novos fármacos com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, de diferentes classes químicas e mecanismos de ação, continuam a ser um grande desafio tanto na academia, como pela indústria farmacêutica mundial.

O uso de plantas medicinais pela população como alternativa para tratar inúmeras doenças é uma prática muito comum desde antes de Cristo (DUTRA et al., 2016). Plantas medicinais são conhecidas por terem grande potencial para a cura de doenças, fornecendo inúmeras matérias-primas à indústria farmacêutica e química, alta diversidade molecular, com complexidade estrutural singular, além de inspiração ao estudo e planejamento de novos fármacos e medicamentos (BISWAS et al., 2015).

Desde a antiguidade, até os dias atuais, produtos naturais continuam desempenhando um importante papel para descoberta de novos fármacos e como intermediários químicos para o desenvolvimento de fármacos derivados de fontes naturais (NEWMAN; CRAGG, 2012). No início da civilização humana, a ingestão de ervas e folhas de plantas pode ter sido uma das

primeiras formas de utilização de produtos naturais para alívio de dores e cura de doenças (GRANDHI; MEHTA, 2013). Entretanto, muitos usos populares ainda carecem de confirmação e validação científica quanto a seus efeitos terapêuticos e de sua potencial toxicidade, o que abre um enorme campo de ação para a pesquisa em Química Medicinal de produtos naturais e do isolamento e caracterização de novos metabólitos ativos.

A árvore *Dillenia indica* Linn, pertencente à família de Dilleniaceae, é a espécie mais comum do gênero *Dillenia*, com folhas verdes com nervuras e frutos grandes, de casca dura que se origina por sobreposição. É originária da Ásia e sua ocorrência é preferencialmente em regiões tropicais e subtropicais (The Plant List, 2013). É comumente utilizada na medicina popular no tratamento de dores musculares, onde uma infusão de cascas, folhas e frutos é preparada e usada topicamente. Também há relatos de uso para o tratamento de febre, diarreia, tosse, constipação, dentre outros. Na medicina tradicional da região sul do estado de Minas Gerais, especialmente em ambiente rural, é utilizada uma infusão dos frutos desta planta, em associação ou não com arnica (*Arnica montana*) para o tratamento tópico de dores ocasionadas por contusões de maneira geral, porém sem qualquer relato científico na literatura.

Neste contexto, o presente projeto teve como principal proposta, estudar em modelos *in vivo* o efeito analgésico e anti-inflamatório do extrato bruto e suas frações dos frutos de *D. indica* visando confirmar tais propriedades e validar cientificamente seu uso popular como analgésico e anti-inflamatório. Além disso, pretendeu-se estudar o provável mecanismo de ação analgésico, além de um estudo químico de desreplicação do extrato bruto e frações acetato de etila (Ac) e hidroalcolólica (HA) por CLAE-MS e CLAE-MSMS na busca pela identificação de seus constituintes químicos bioativos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A seguir teremos uma revisão da literatura abordando a analgesia, o processo inflamatório e a espécie estudada *Dillenia indica* Linnaeus.

2.1 DOR

Segundo a Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP, 2017), a dor pode ser caracterizada como uma experiência sensitiva e emocional associada a uma lesão real ou potencial dos tecidos. É um aviso para o sistema nervoso, a fim de iniciar uma resposta motora e minimizar o prejuízo físico causado (MILLAN, 1999). Existe uma confusão entre os termos dor e nocicepção sendo que este segundo caracteriza os sinais que chegam ao sistema nervoso central resultante da ativação dos receptores sensoriais (nociceptores) que fornecem informações sobre um estímulo nocivo ao corpo. Já a dor é uma experiência emocional, que pode ser relacionada com a percepção do estímulo e a capacidade de abstraí-lo (FEIN, 2011).

A dor, assim como a inflamação, pode ser classificada como aguda ou crônica. A primeira é um sinal de alerta para o corpo, tem uma duração limitada e é eliminada quando o estímulo nocivo cessa; embora muitas vezes seja benéfica ao organismo, deve ser tratada a fim de não se tornar recorrente. Já a dor crônica tem caráter persistente podendo estar presente mesmo após a cura da lesão que a deu origem (APED, 2017; GUINDON, 2017).

A dor pode ser provocada por um estímulo térmico, químico ou mecânico ocasionando ou não um ferimento tecidual; uma vez recebido tal estímulo os nociceptores (e outros receptores sensoriais) transmitem informações periféricas para a área corticais dos dois grandes sistemas de fibras ascendentes: o sistema anterolateral que é responsável pela transmissão nociceptiva para a região de troncos e membros, e o sistema trigemial que está associado à sensação de dor na região da face. Ambos sistemas ascendentes, ativam o sistema descendente inibitório da dor, enviando informações para que o estímulo doloroso seja interrompido (FEIN, 2011; MARQUEZ, 2004).

Os nociceptores são receptores sensoriais especializados, distribuídos nas camadas superficiais da pele e de diferentes órgãos e tecidos (Figura 1), capazes de responder a estímulos

nocivos ao organismo (BERNE et al., 2004, DUBIN; FARAH, 2006; GUYTON, 2011; PATAPOUTIAN, 2010;). São terminações nervosas livres, constituídas por fibras nervosas, cuja velocidade de transmissão do potencial de ação é variável de acordo com o tipo de fibra envolvida (FEIN; GUYTON, 2011). As fibras do tipo C são finas (0,5 mm de diâmetro), amielínicas, responsáveis por conduzir as sensações dolorosas mais lentamente; já as fibras A δ , A β e A α são mais grossas (4 mm de diâmetro), mielinizadas e conduzem mais rapidamente à transmissão nociceptiva (FEIN, 2011).

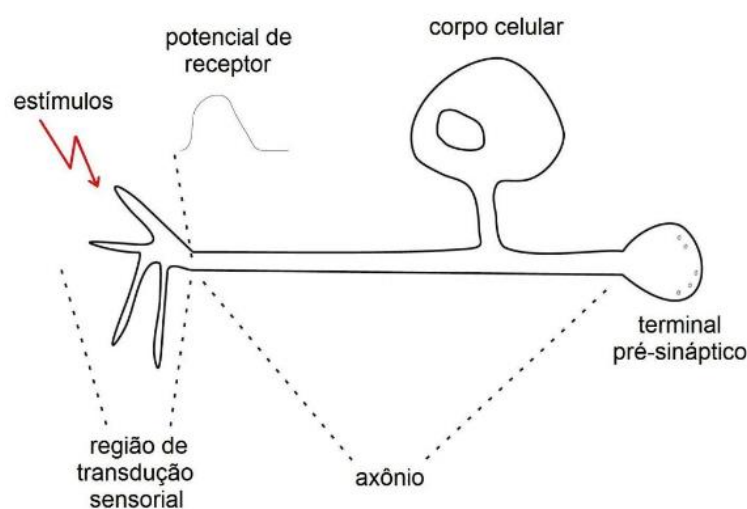


Figura 1 – Desenho esquemático de um nociceptor.
Fonte: FEIN, 2011.

Basicamente o processo de transmissão da dor pode ser dividido em 5 etapas: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção. A transdução consiste na transformação de um estímulo nocivo, seja ele mecânico, térmico ou químico, gerando um sinal elétrico nas terminações sensoriais (TRANQUILLI et al., 2005). Quando o estímulo nocivo ocorre nos canais iônicos, estes podem se abrir e assim tornar-se permeáveis aos íons cálcio e sódio, sendo estes responsáveis pela despolarização do terminal (FORNASARI, 2014).

A condução é o processo o qual o potencial de ação percorre os axônios dos nociceptores para chegar até a medula espinhal; quando o potencial de ação chega no terminal do nociceptor promove a abertura do canal de cálcio permitindo o influxo de Ca^{2+} e liberando neurotransmissores. (FORNASARI, 2014).

A transmissão é a propagação do impulso nervoso através do sistema nervoso; os sinais elétricos são levados até a medula espinhal e a partir dela são transmitidos por nervos periféricos com fibras nervosas aferentes (sensoriais) ou eferentes (motoras); quando o nervo central

aferente é ativado o estímulo passa a ser transformado em potencial de ação e transmitido para o corno dorsal da medula espinhal onde ocorre a sinapse com os neurônios de segunda ordem (MUIR III, 2009). Posteriormente a essa sinapse com os neurônios de segunda ordem, as fibras aferentes de segunda ordem seguem o trato espinotalâmico e ascendem até o tálamo onde é transmitido o estímulo nocivo e em seguida a informação é levada até o córtex somatossensorial onde este estímulo será interpretado como doloroso, sendo esta a via ascendente da dor (Figura 2) (BASBAUM et al., 2009). A modulação é o processo pelo qual a transmissão é facilitada ou inibida, podendo ocorrer bloqueio dos receptores das substâncias neurotransmissoras, inibição de liberação desses neurotransmissores ou impedimento do processo de transmissão nociceptiva (MUIR III, 2009, TRANQUILLI et al., 2005).

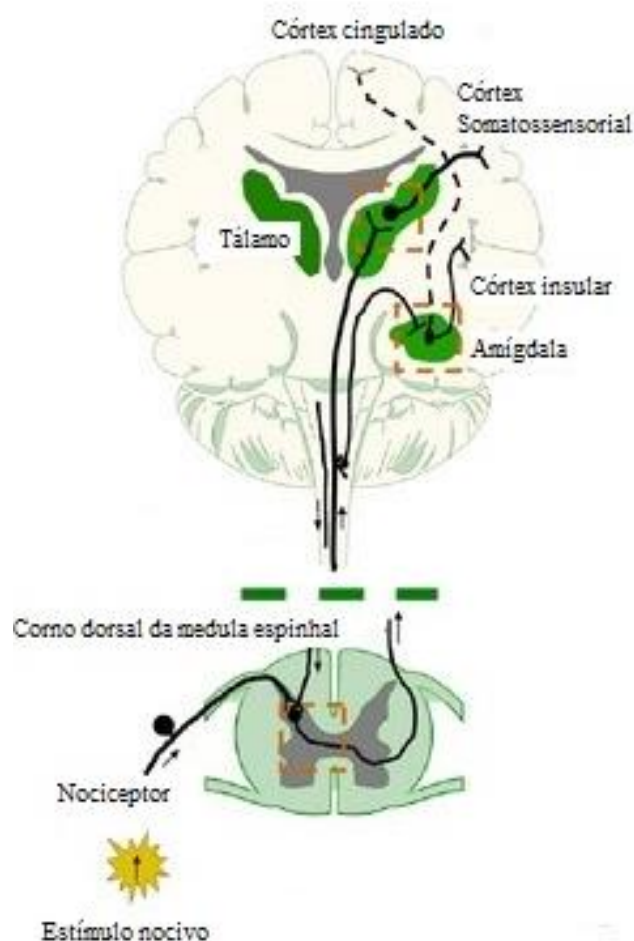


Figura 2 – Via ascendente da dor.

Fonte: Adaptado de BORROTO-ESCUELA et al. (2013).

Por fim, a percepção se dá quando o sinal elétrico é reconhecido no cérebro e então é percebido como dor (MUIR III, 2009).

Existem alguns fármacos utilizados para o tratamento da dor que incluem os opioides, anti-inflamatórios não-esteroidais, antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésicos e canabinoides. Dentre estas classes terapêuticas, destacam-se os AINEs e os opioides, pois podem ser utilizados no tratamento de dores suave e moderada e severa (GUINDON, 2007; MATHEWS, 2000; VARDEH, 2016).

Opioides são produtos de origem natural, sintética, semissintética e endógena capazes de interagir com receptores opioides presentes no corpo. Esta classe terapêutica constitui os fármacos analgésicos mais antigos, com representantes como a morfina (1), diidrocodeína (2) e codeína (3, Figura 3) (BRUNTON et al., 2006; PATRICK, 2013). Esses fármacos atuam por meio de uma ligação reversível a receptores específicos (Mu (μ), Kapa (κ) e Delta (δ)) que se encontram no Sistema Nervoso Central e na medula espinhal, modulando a atividade sensitiva (FRAGATA, 2008). Os receptores δ são responsáveis pela analgesia, mas também podem modular funções cognitivas e de dependência física, estando localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos. Quanto aos receptores κ , possuem funções de nocicepção, controle de diurese, termorregulação e secreção neuroendócrina, estando localizados no hipotálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa na medula espinhal, além de neurônios sensitivos periférico. Os receptores μ regulam funções como a nocicepção, ciclo respiratório e trânsito intestinal, estando localizados nas lâminas III e V do córtex cerebral, no tálamo, substância cinzenta periaquedutal, substância gelatinosa e trato gastrintestinal (DHAWAN et al., 1996)

Estes receptores são acoplados a proteína G, e para promover a analgesia agem de duas maneiras: i) abrindo canais de K^+ dos neurônios pós-sinápticos causando uma hiperpolarização da célula e evitando a continuidade da transmissão do sinal; ii) fechando canais de Ca^{2+} dependentes de voltagem presentes nos neurônios pré-sinápticos, evitando assim que sejam liberados neurotransmissores (KATZUNG et al., 2014).

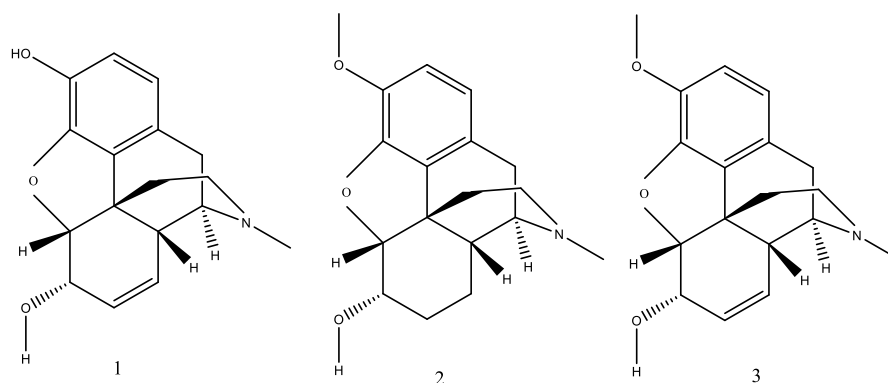


Figura 3 - Estruturas químicas da morfina (1), diidrocodeína (2) e codeína (3).
Fonte: Do autor.

Os canabinoides são compostos derivados da planta *Cannabis sativa*, popularmente conhecida como maconha, possuem efeitos terapêuticos como antieméticos, anticonvulsivantes, analgésicos e estimulantes de apetite. Os receptores canabinoides (CB) pertencem a família dos receptores que são acoplados a proteína G e o mecanismo de transdução dos sinais destes receptores envolve vias de participação da proteína G_{i0} que inibe a adenil ciclase e ativa quinases e receptores CB_1 modulam canais iônicos. Os receptores CB_1 e CB_2 estão presentes no Sistema Nervoso Central (SNC), o CB_1 está localizado nos terminais nervosos pré-sinápticos e é responsável pela maioria dos efeitos neuro-comportamentais dos canabinoides. Já o CB_2 é o principal receptor de canabinoide no sistema imune (DEVANE et al., 1992).

Canabinoides são liberados por neurônios pós-sinápticos e agem como receptor CB_1 , que são encontrados em terminais axônicos, de neurônios pré-sinápticos, como resultado desta ligação temos a diminuição de liberação de outros neurotransmissores (FOWLER, 2001).

2.2 PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é um processo que ocorre como reação dos tecidos à agressão, acontece como resposta inespecífica caracterizada por alterações que tendem a limitar o efeito da agressão, para que aconteça eliminação, neutralização e destruição da lesão (KUMAR et al, 2008). O processo é caracterizado pela saída de líquidos e células lesionadas e induz o reparo celular. Existem cinco sinais cardiais (Figura 4) no processo inflamatório: calor (aquecimento), rubor (vermelhidão), tumor (inchaço), dor e perda de função. Essas manifestações da

inflamação são consequência das alterações vasculares e do recrutamento e ativação dos leucócitos. O calor e o rubor são decorrentes da vasodilatação que aumenta a circulação de sangue (hiperemia) na área inflamada, e por isso, ocorre vermelhidão devido à concentração do sangue e aumento da temperatura pelo aumento do fluxo sanguíneo. O tumor acontece pelo aumento da permeabilidade vascular que permite a excreção de líquidos e, portanto, o edema. A dor aparece tanto por compressão dos nervos pelo tumor quanto por substâncias químicas liberadas no organismo. A perda da função pode ser total ou parcial e decorre de vários fatores, especialmente do edema e da dor (BARNES et al., 2016; HARVELY, 2011; KUMAR et al., 2011; MCKEERROW, 2015; MILLER, 2011; NEWMAN e CRAGG, 2016).

O processo inflamatório é uma reação natural do organismo ao dano ou injúria tecidual e está associado à liberação de citocinas, quimiocinas (e.g. TNF- α , lipoxinas, cininas, prostaglandinas, leucotrienos) e proteínas de sinalização no organismo, a partir de tecidos e células migratórias (FU et al., 2015).

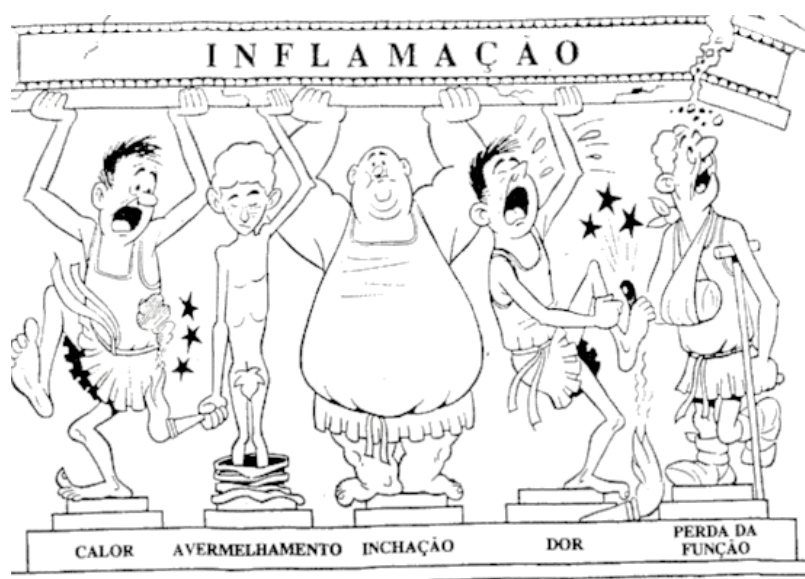


Figura 4 - Representação caricaturada dos sinais cardiais do processo de inflamação.

Fonte: Figura retirada da internet.

A inflamação pode ser caracterizada como aguda ou crônica, esta primeira acontece rapidamente e é de curta duração (de minutos a dias), e caracteriza-se pela exsudação de líquidos e proteínas plasmáticas, além de acúmulo de leucócitos, predominantemente neutrófilos. Já a inflamação crônica tem aparecimento vagaroso e sua duração pode ser de semanas, meses ou até anos, caracterizando-se pelo influxo de linfócitos e macrófagos com

proliferação vascular associada e cicatrização (fibrose) (BARNES et al., 2016; KOOGAN, 2009).

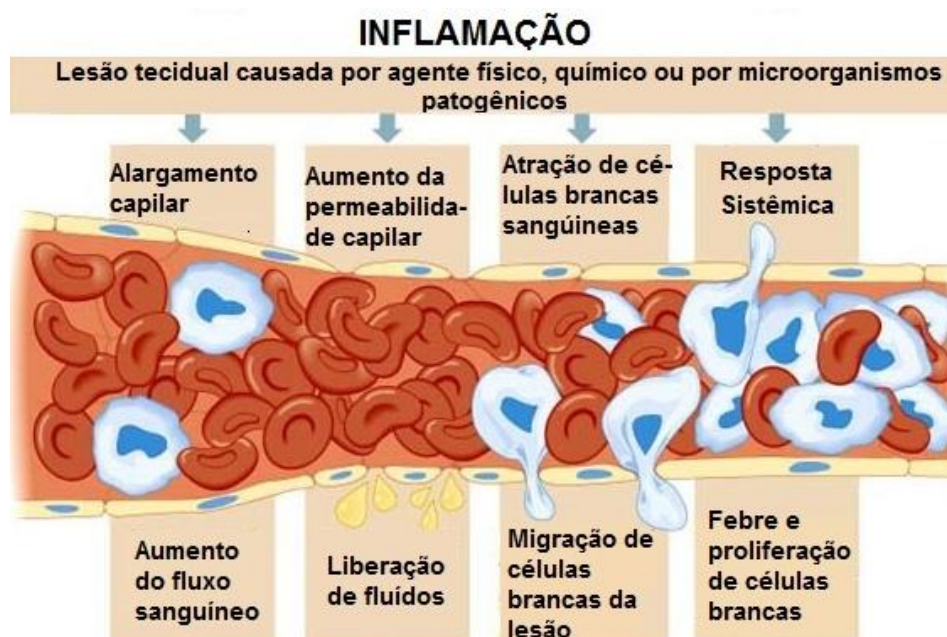


Figura 5 - Representação das fases de instalação e progressão do processo inflamatório.
Fonte: Adaptado de MacGraw Hill Co. Inc.

A inflamação aguda é classificada de acordo com as características do exsudato, conforme o tipo, a duração e a intensidade da agressão. Este processo é uma resposta fisiológica do organismo com o intuito de neutralizar, inativar e eliminar o agente causador da inflamação. As respostas do organismo podem ser: a eliminação do agente agressor e retorno da estrutura local; a eliminação do agressor, mas com lesão tecidual; e a substituição dos tecidos lesados por fibrose ou, ainda, a permanência do agressor e a consequente evolução para a inflamação crônica (KOOGAN, 2009; SINGH et al., 2016). Quando o exsudato é majoritariamente formado por líquido, as inflamações são denominadas inflamações serosas. Este fluido que se acumula contém macromoléculas (e.g. albumina) e algumas células como neutrófilos e hemácias (KOOGAN, 2009).

A inflamação crônica é caracterizada pela sua duração prolongada, na qual a inflamação ativa, destruição tecidual e reparação por fibrose ocorrem simultaneamente. Essa inflamação também pode ser gerada pela persistência das inflamações agudas (congestão, aumento da permeabilidade vascular, exsudato inflamatório) em conjunto com a proliferação das defesas (fase proliferativa), aumento local dos vasos (neoformação vascular), proliferação de linfócitos

e monócitos e de tecido conjuntivo fibroso para novas defesas inflamatórias (BOGLIOLO, 2013).

De modo geral, o processo inflamatório crônico tem início gradual e duração prolongada, com sintomas e sinais menos graves dos encontrados na inflamação aguda (VERDAM et al., 2017).

A inflamação crônica envolve interações complexas entre as diferentes células e seus mediadores secretados. Os macrófagos são células teciduais derivadas dos monócitos do sangue circulante, e são as células dominantes na inflamação crônica. Essas células estão dispersas em vários tecidos conjuntivos, e são encontrados também no fígado, baço, linfonodos e sistema nervoso central. Os macrófagos constituem o sistema de fagócitos mononucleares, que atuam como filtro para materiais particulados, microorganismos e células senescentes, bem como células efectoras que eliminam microorganismos em respostas imune humoral e celular. Os macrófagos são ativados por duas vias diferentes, a via clássica e a alternativa. Na via clássica, a ativação é induzida pelos produtos microbianos (endotoxinas) e por sinais derivados da célula T (citocina IFN- γ). Os macrófagos ativados produzem enzimas lisossômicas, aumentando a sua habilidade em destruir organismos fagocitados e secretar citocinas que estimulam a inflamação. Essas células são importantes na defesa do hospedeiro contra infecções microbianas. A ativação alternativa de macrófagos, é induzida por citocinas como IL-4 e IL-3, sintetizadas pelos linfócitos T. Os linfócitos são células de sinalização e constituem os principais orientadores da inflamação em várias doenças autoimunes e inflamatórias crônicas. A ativação dos linfócitos B e T ocorre como parte da resposta imune adaptativa em infecções e doenças imunológicas. Os linfócitos B se desenvolvem em plasmócitos e secretam anticorpos, enquanto que os linfócitos T CD4⁺ são ativados para secretarem citocinas (KOOGAN et al., 2008; KUMAR et al., 2008).

A terapêutica atual da inflamação inclui fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (AINEs) (FU et al., 2015). Os AINEs são os anti-inflamatórios mais utilizados, atuam inibindo a enzima ciclooxigenase (COX) e assim impedindo a formação de mediadores do processo inflamatório como as prostaglandinas e os tromboxanos. O primeiro anti-inflamatório não esteroideal descoberto foi o ácido acetilsalicílico (Aspirina®), um derivado do ácido salicílico que, por sua vez, é derivado da salicina que é obtida originalmente das cascas do tronco de *Salix alba*. Além da Aspirina® (4), o ibuprofeno (5), piroxicam (6) e diclofenaco (7, Figura 6) também se destacam na indústria farmacêutica para o tratamento dos sintomas da inflamação. No entanto, a maior desvantagem clínica desses fármacos está relacionada aos efeitos colaterais e à possibilidade de recorrência da inflamação após a descontinuação da medicação (COUTINHO et al., 2009; FU et al., 2015).

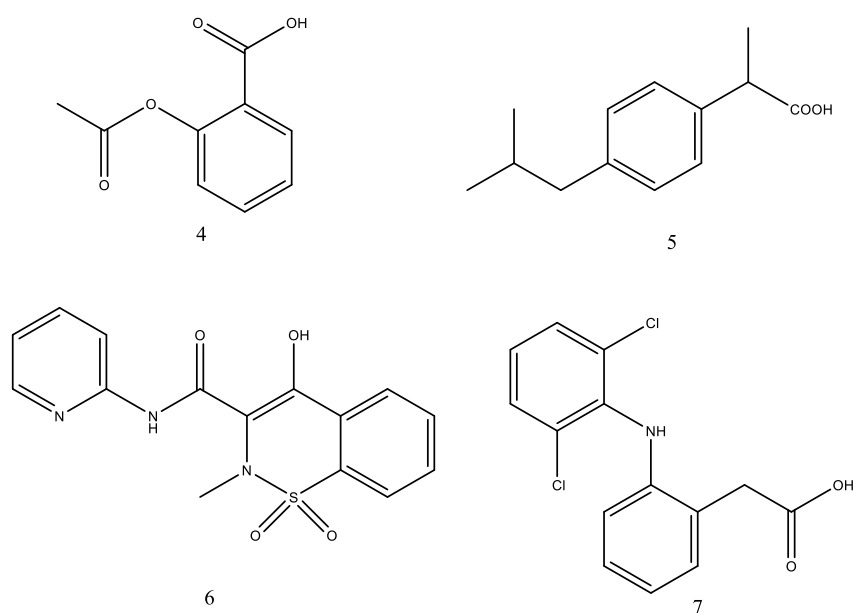


Figura 6 - Estruturas químicas da Aspirina (4), ibuprofeno (5), piroxicam (6) e diclofenaco (7).
Fonte: Do autor.

Os produtos naturais ganham destaque na descoberta de novos fármacos anti-inflamatórios, uma vez que várias classes químicas de metabólitos vegetais já tiveram suas propriedades anti-inflamatórias comprovadas cientificamente, a exemplo de terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides. O fitoterápico Acheflan®, é encontrado na forma de aerossol ou creme e foi desenvolvido a partir do óleo essencial de erva-balleira (*Cordia verbenacea*, Borraginaceae). Outro exemplo é o Daflon 500mg®, composto por 50 mg de fração flavonoídica purificada e 450 mg de diosmina (COUTINHO et al., 2009).

2.3 *DILLENIA INDICA* LINNAEUS

A família Dilleniaceae (dileniáceas) é constituída por 11 diferentes gêneros (*Acrotrema*, *Curatella*, *Davilla*, *Didesmandra*, *Dillenia*, *Doliocarpus*, *Hibbertia*, *Neodillenia*, *Pinzona*, *Tetracera* e *Traxilisa*) e cerca de 219 espécies cientificamente aceitas, podendo ser classificadas como árvores, arbustos ou lianas. As dileniáceas são plantas de regiões tropicais e subtropicais e ocorrência predominante nas regiões de Cerrado (The Plant List, 2013). O gênero *Dillenia* é constituído por aproximadamente 60 espécies, algumas já descritas por inúmeras propriedades farmacológicas e como fontes de metabólitos secundários como flavonoides, terpenos,

esteroides, taninos, dentre outros (GANDHI; MEHTA, 2013; SINGH et al., 2016). A espécie *D. indica* Linn., também conhecida no Brasil como dilênia, maçã-de-elefante, flor-de-abril e árvore-do-dinheiro, dentre outros nomes populares, é a espécie mais comum da família Dilleniaceae, sendo originária de florestas verdes e úmidas, distribuída em grande parte, na Índia, Indonésia, Tailândia, China e alguns outros países, incluindo o Brasil (FU et al., 2015; KUMAR et al., 2011). Originária de países asiáticos, são árvores médias de até 4 metros de altura (Figura 7A), de tronco reto e casca marrom avermelhada (Figura 7B), frutos com formato de globo, podendo alcançar até 20 centímetros de diâmetro e de casca dura (Figura 7C) e com folhas verde-claro com nervuras (Figura 7D). No Brasil, o florescimento da árvore acontece de janeiro a outubro e a frutificação entre abril e agosto (ABDILLE et al., 2005).



Figura 7 - *Dillenia indica* Linn. (A) árvore, (B) tronco, (C) fruto (D) folhas.
Fonte: Do autor.

Um estudo realizado em 2013, por Gandhi e cols. analisou os aspectos terapêuticos, farmacognóstico e fitoquímicos da *D. Indica* e *D. pentagyna* Roxb. A análise farmacognóstica revelou que as duas espécies contêm folhas, cascas e frutos bastante distintos. O estudo fitoquímico revelou que ambas espécies são fontes de flavonoides, terpenoides, taninos, além

de outros metabólitos minoritários. Nas cascas foram quantificados cerca de 10% de taninos, além de ácido betulínico (**8**), aldeído betulíco (**9**), flavonoides como a ramnetina (**10**), lupeol (**11**), miricitina (**12**), naringerina (**13**), além de derivados de quercetina (**14**), campfenol (**15**) e triterpenoides. Na fração *n*-hexânica, oriunda da partição do extrato metanólico das cascas, foram identificados ácido betulíco, lupeol, estigmasterol (**16**, Figura 8) e aldeído betulínico. Além disto, também foram identificados nas folhas outros flavonoides, triterpenoides, esteroides e taninos. O estudo do extrato metanólico dos frutos de *D. indica* revelou cerca de 34% do total de compostos fenólicos e polissacarídeos (GANDHI et al., 2013).

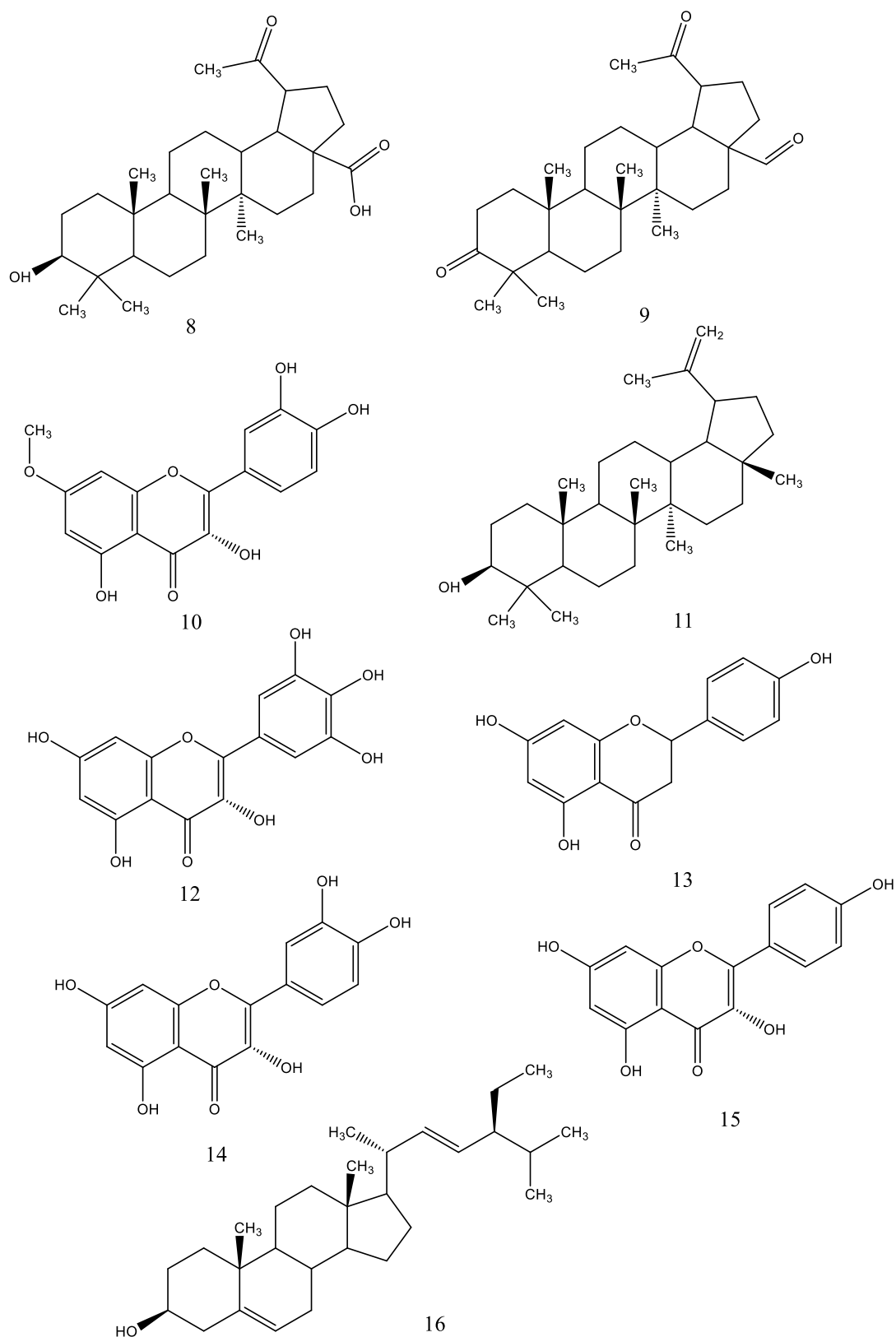


Figura 8 - Estruturas químicas do ácido betulínico (8), aldeído betúlico (9), ramnetina (10), lupeol (11), miricitina (12), naringerina (13), quercetina (14), campfenol (15) e estigmasterol (16), metabólitos isolados de diversas partes de *D. indica*.

Fonte: Do autor

Dentre suas propriedades farmacológicas, *D. indica* já foi descrita por sua atividade anti-leucêmica, anti-inflamatória, antioxidante, antiproliferativa, antidiabética, antimicrobiana, antifúngica, antidiarreica e citotóxica (GANDHI et al., 2013). Em um estudo fitoquímico mais recente, Biswas e cols. relataram a presença de alcaloides, glicosídeos, esteroides, flavonoides, taninos, saponinas e fenólicos no extrato alcoólico das folhas de *D. indica*. Numa análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi evidenciada a presença de flavonoides, esteroides e aminoácidos, sendo alguns identificados como quercetina, campfenol, colesterol (**17**) e ácido glutâmico (**18**, Figura 9). Neste estudo os autores concluíram que a maioria dos compostos biologicamente ativos estava presente no extrato metanólico das folhas de *D. indica*, sem, contudo, identificar qual ou quais seriam os constituintes químicos responsáveis pelas atividades biológicas estudadas (BISWAS et al., 2015).

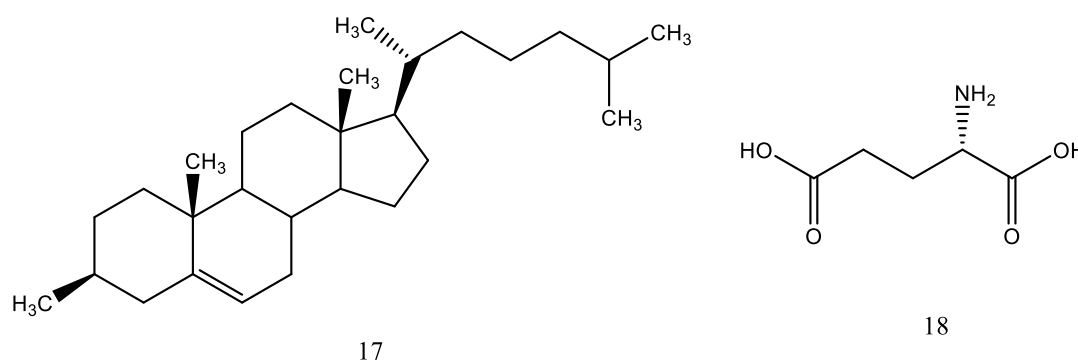


Figura 9. Estruturas químicas do colesterol (**17**) e ácido glutâmico (**18**) isolados das folhas de *D. indica*.
Fonte: Do autor.

O extrato do tronco de *D. indica* também foi estudado quimicamente, levando ao isolamento de lupeol, aldeído betulínico, ácido betulínico e estigmasterol. A avaliação das propriedades antimicrobiana e citotóxica, do extrato metanólico bruto e suas frações de partição (*n*-hexano, CCl₄, CHCl₂ e CHCl₃) revelou uma baixa atividade antimicrobiana contra fungos e bactérias gram-positivas e gram-negativas. No entanto, os extratos apresentaram significativa atividade citotóxica frente a *Artemia salina*. Adicionalmente, os extratos apresentaram atividades sequestrante de radicais livres significativa, semelhantes ao ácido ascórbico (BISWAS et al., 2015).

A avaliação das propriedades anti-inflamatórias do extrato metanólico das folhas de *D. indica* revelou significativa atividade anti-inflamatória no teste de edema de pata de rato e em ensaio de permeabilidade capilar induzida por ácido acético. Estas descobertas corroboram

parte do uso folclórico do chá de folhas de *D. indica* contra doenças inflamatórias (YESHWANTE et al., 2009).

O extrato das cascas de *D. indica* f. *elongata*, outra variação da mesma família, também foi estudado quanto às suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias, sendo que os resultados mostraram que a fração AcOEt possuía atividades analgésicas central e periférica significativas, semelhantes à pentazocina e indometacina. Os autores concluíram que estas propriedades analgésica e anti-inflamatória da planta poderiam ser, provavelmente, atribuídas à presença de flavonoides, taninos e compostos fenólicos, porém não houve o isolamento de nenhum metabólito ativo (SINGH et al., 2016).

As propriedades antioxidante, antidiabética e anti-hiperlipidêmica de extratos dos frutos desta planta também foram avaliadas. O estudo do conteúdo fenólico do extrato metanólico bruto e de suas frações AcOEt e aquosa dos frutos de *D. indica* revelaram um maior percentual de ácido tânico na fração metanólica (34,1%), seguido da fração ACOEt com 9,3% e do extrato aquoso com 1,4%. A atividade antioxidante do extrato e frações foi determinada em modelos *in vivo*, utilizando o ácido ascórbico como padrão positivo e revelando uma maior atividade no extrato metanólico. Os resultados indicaram que a quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos poderia favorecer a atividade antioxidante (KOOGAN, 2009).

Estudos sobre o potencial antidiabético e anti-hiperlipidêmico do extrato metanólico de folhas de *D. indica* foram realizados em modelo de diabetes induzida por estreptozotocina em camundongos. Os resultados indicaram uma atividade significativa, além da diminuição do peso corporal após o tratamento com os extratos, o que levou os autores à conclusão de que o tratamento por via oral e administrado em doses diárias poderia ser útil para o controle do diabetes mellitus e de outras doenças associadas a esta disfunção metabólica (BARNES et al., 2016).

Neste desafio, os produtos naturais desempenham um papel decisivo, sejam como fontes de uma diversidade química insuperável, seja como fonte de matérias-primas para uso em processos semissintéticos, ou ainda como modelos estruturais na inspiração ao planejamento racional de novos fármacos. Os produtos naturais têm contribuído, diretamente ou não, de forma decisiva à descoberta de novos candidatos a fármacos, de novos mecanismos de ação e de novos alvos terapêuticos para o tratamento de inúmeras doenças, assim como na aprovação e lançamento de novos fármacos de praticamente todas as classes terapêuticas (BARNES, et al., 2016; NEWMAN, 2016).

O exemplo mais recente da importância da química de produtos naturais na história da clínica médica, na descoberta de novos alvos terapêuticos e de seu impacto na descoberta de

fármacos e de padrões moleculares inéditos foi a concessão, em 2015, do prêmio Nobel de fisiologia ou medicina aos pesquisadores Willian C. Campbell e Satoshi Omura, em reconhecimento à descoberta e desenvolvimento da avermectina e seu análogo ivermectina, utilizadas contra a oncocercose (cegueira do rio) e filariose (elefantíase), respectivamente. A terceira pesquisadora consagrada com a concessão do prêmio em 2015 foi a chinesa Youyou Tu, que baseada em descrições da medicina tradicional chinesa, descobriu a artemisinina, utilizada até hoje contra a malária (MCKEERROW, 2015).

3 JUSTIFICATIVA

Na medicina popular do Brasil, incluindo sul de Minas Gerais, a *Dillenia indica* Linn. é tradicionalmente utilizada para o tratamento de febre, constipação, diarreia, dor estomacal e, principalmente, dores musculares e articulares, dentre outras indicações. As preparações utilizam em geral folhas, cascas e os frutos na forma de infusão para tratamento tópico ou chá da mistura destas partes da planta, indicado para o tratamento de dores musculares, diarreia e redução da tosse.

A partir desse conhecimento popular, foi realizada uma busca na plataforma *SciFinder* utilizando-se a palavra-chave “*Dillenia indica*”, revelando apenas 140 artigos científicos, indicando que esta planta é, ainda, pouco estudada, além de não haver qualquer estudo sobre as propriedades analgésicas e anti-inflamatória dos frutos. Portanto, não há registro de nenhuma validação científica de sua eficácia como um “remédio” natural. Diante disso, nosso grupo de pesquisa interessou-se pelo estudo das propriedades medicamentosas desta planta, focando sobretudo na avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato dos frutos de *D. indica* em modelos in vivo, além de estudos químicos para caracterizar a constituição do extrato e suas frações, identificando possíveis metabólitos bioativos.

4 OBJETIVOS

Os objetivos geral e específico deste trabalho encontram-se descritos a seguir.

4.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo geral deste projeto foi contribuir com o conhecimento científico acerca do uso popular de *Dillenia indica* (flor-de-abril) para o tratamento da dor e da inflamação, bem como do estudo de seu perfil químico e de possíveis metabólitos secundários com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliação dos possíveis efeitos analgésico e anti-inflamatório do extrato dos frutos, bem como de suas frações;
- b) Estudo do mecanismo de ação analgésico;
- c) Estudo do perfil químico do extrato e suas frações por desreplicação, utilizando-se CLAE-MS e CLAE-MS/MS e auxílio da ferramenta computacional GNPS;
- d) Caracterização e identificação de metabólitos ativos inéditos presentes nas matrizes vegetais com potencial farmacológico.

5 PARTE EXPERIMENTAL

Neste tópico abordaremos a parte química e farmacológica experimental.

5.1 MÉTODO DE EXTRAÇÃO E OBTENÇÃO DOS EXTRATOS

Os frutos de *Dillenia indica* foram coletados no Sul de Minas Gerais, na região de Fama-Alfenas, em propriedade particular, e uma exsicata está depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas com o nº 2713 sob responsabilidade do Prof. Dr. Marcelo Polo. Os frutos foram cortados e secos em estufa até peso constante, na faixa de temperatura de 40-45°C e, posteriormente, triturados em moinho de facas. O material vegetal foi submetido à maceração em etanol por cerca de 9 dias, com troca do solvente (3L) a cada 3 dias. O extrato bruto foi, então, ressuspenso em solução de etanol-H₂O 8:2, filtrado e particionado com hexano e acetato de etila, gerando as respectivas frações hexânica, acetato de etila e um resíduo hidroalcoólico.

5.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA

O extrato e suas frações foram avaliados preliminarmente em modelo de hiperalgesia induzido por formalina em camundongos e a partir desse resultado foi avaliado o possível mecanismo de ação do extrato e suas frações.

5.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos com 7 semanas de vida, provenientes do Biotério da Universidade Federal de Alfenas. Os animais foram alojados no Laboratório de

Fisiologia Translacional em caixas de polipropileno cobertas com grades metálicas, com livre acesso à ração comercial e água, permanecendo em jejum por 8 horas antes dos tratamentos. Estas caixas foram mantidas em sala com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e ciclo claro/escuro de 12-12 horas (luz 07:00-19:00). Todos os protocolos experimentais aos quais os animais foram submetidos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL (Protocolo nº: 27/2016). Após os experimentos a eutanásia foi realizada a partir de um anestésico inalatório (excesso de halotano).

5.2.2 Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina

Os animais foram previamente tratados por via oral ($n = 12$ animais por grupo) com veículo 10 mL/kg (carboximetilcelulose 0,5%), indometacina 10 mg/kg, morfina 3 mg/kg (via intraperitoneal) ou as substâncias-teste: extrato bruto dos frutos nas doses de 30, 100 ou 300 mg/kg, frações hexano, acetato de etila ou hidroalcoólica dos frutos nas doses de 3, 10 ou 30 mg/kg. Os tratamentos orais (p. o.) com veículo, indometacina, extrato e frações foram administrados 1 hora antes da formalina enquanto a morfina foi administrada por via intraperitoneal (i.p.) 30 minutos antes. Após esse tempo, foi injetada 20 μ L de uma solução de formalina 2.5% (v/v) (formaldeído diluído em salina) na face dorsal da pata traseira direita do animal (COUTO et al., 2011). Foi avaliado o tempo em segundos, que o animal permaneceu lambendo a pata. Com base no padrão de respostas analisamos a primeira fase, chamada neurogênica, durante os primeiros 5 minutos, e segunda fase, inflamatória, durante os próximos 15-30 minutos após a injeção de formalina.

5.2.3 Ensaio de Campo Aberto

Para descartar os possíveis efeitos relaxantes musculares inespecíficos, o desempenho exploratório ou atividade exploratória dos camundongos foi avaliado no aparato de campo aberto (COUTO et al., 2011; VILELA et al., 2009). Grupos de camundongos ($n = 8$) recebem

veículo, o extrato bruto (na dose de 300 mg/kg) e suas frações (na dose de 30 mg/kg), 1 hora antes do teste. Cada animal foi colocado no centro do campo aberto para a observação por 5 minutos da frequência da locomoção.

5.3.4 Avaliação do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo

Estes experimentos foram realizados para avaliar a participação dos sistemas opioide e/ou canabinoide do extrato bruto e suas frações, nas menores doses. Utilizou-se grupos de animais (n = 7-9 por grupo) que foram divididos nos seguintes grupos experimentais: veículo 10 mL/kg (carboximetilcelulose 0,5%), extrato bruto (30 mg/kg p.o.), frações acetato de etila, hidroalcoólica e hexânica (3 mg/kg; p.o.), morfina (3 mg/kg; i.p.) ou WIN55,212-2 (1 mg/kg; i.p.).

Para verificar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo os animais foram tratados com o veículo, o extrato bruto ou as frações, administrados por via oral 1 hora antes do teste de formalina, enquanto que a morfina ou o WIN55,212-2 foram administrados por via intraperitoneal 30 minutos antes do teste. Os mesmos animais foram pré-tratados com solução salina 0,9% (10 mL/kg; i.p.), antagonista não seletivo do receptor opioide, naloxano (1 mg/kg; i.p.) ou antagonista do receptor CB1, AM251 (3 mg/kg; i.p.) 15 minutos antes, no teste de formalina previamente descrito.

5.3.5 Ensaio de toxicidade aguda

Os animais utilizados no ensaio de campo aberto que foram tratados por via oral com a maior dose do extrato (300 mg/kg) e a maior dose de suas frações (30 mg/kg) permaneceram em observação. Os animais foram observados durante 7 dias em 2 períodos do dia (manhã e tarde) durante 1 hora, na própria caixa moradia. A cada dia, foram feitas medidas de peso e observação do quadro comportamental de cada animal. Todos os animais tiveram livre acesso à água e alimento.

5.3.6 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados usando o programa de software GraphPad Prism Versão 6.0 e expressos como média \pm S.E.M. As diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas pela aplicação de uma análise de variância (*One Way ANOVA*) seguida pelo pós-teste de *Newman-Keuls*. P-Valores inferiores a 0,05 ($p < 0,05$) foram utilizados como nível de significância (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

5.4 ANÁLISES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRO DE MASSAS SEQUENCIAL (CLAE-DAD-EMEM)

O estudo químico da constituição da matriz (extrato ou fração) foi analisado por CLAE acoplado à espectrometria de massas, em colaboração com o Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes (USP-RP), visando à desreplicação e identificação de metabólitos.

Os solventes utilizados para a preparação das amostras e análises por CLAE foram todos da marca J.T. Baker todos filtrados e posteriormente desgaseificados com vácuo e banho de ultrassom; além de H₂O deionizada (18m Ω , Milli-Q, Millipore).

Para os experimentos de espectrometria de massas sequencial (EM/EM) utilizou-se equipamento de CLAE da marca Shimadzu® (Kioto, Japão), composto de bombas de alta pressão (LC-20AD), desgaseificador (DGU-20A3), injetor com amostrador de 100 μ L (SIL-20A HT), detector espectrofotométrico de arranjo de diodo SPD-M20A, módulo de comunicação (CBM-20A) e forno para coluna (CTO-20A). Injeções realizadas automaticamente (20 μ L). Utilizou-se coluna cromatográfica Sigma-Aldrich analítica (Spherisorb ODS-2, 5 μ m, 4,6 mm de diâmetro por 250 mm de altura), acoplada a uma pré-coluna de 1 cm, de material equivalente. O equipamento de CLAE foi acoplado a um espectrômetro de massas AmaZon-SL íon trap (IT) Bruker Daltonics® (Billerica, Massachusetts, EUA). Os espectros foram adquiridos em modo positivo e negativo, empregando IES, e analisador de massas do tipo íon trap. Capilar 3500 v; end plate offset 500 v; temperatura do gás de secagem (N₂) 330°C, vazão 10 L.min⁻¹ e pressão 60 psi. O programa

empregado na aquisição dos dados foi o software Bruker Compass DataAnalysis 4.3 (Bremen, Germany). Os dados gerados por espectrometria de massas foram analisados pelo software Bruker DataAnalysis ver. 4.1 (Bruker Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA). O seguinte gradiente de eluição foi empregado com o solvente A = água/ ácido fórmico 99:1 (v/v) e o solvente B = acetonitrila/ácido fórmico 99:1(v/v). Perfil de eluição 0-5 min: 5-10% B; 5-35 min: 10-16% B; 35-65 min: 16-100%; 65-70 min: 100-100%; 70-75 min:100-5% e 75-80 min: 5%-5%.

Além disso uma Rede Mundial de Material Molecular de Produtos Naturais (GNPS – *Global Natural Product Social Molecular Networking*) foi utilizado na busca de diferentes substâncias químicas presentes nas amostras. A introdução dos dados e formação da rede molecular se deu através da conversão dos arquivos de CL-EM/EM.raw para .mzXML utilizando o software MSConvert e submetendo-os no fluxo de trabalho do GNPS através do site de acesso livre <https://gnps.ucsd.edu/ProteoSAFe/static/gnps-splash.jsp>. A rede molecular foi criada usando os parâmetros gerais a seguir: Os dados foram filtrados removendo todos os picos EM/EM dentro de +/- 17 Da do íon precursor m/z. Os espectros EM/EM foram filtrados por janela escolhendo apenas os 6 melhores picos na janela +/- 50 Da em todo o espectro. Os dados foram então agrupados com *MS-Cluster* com uma tolerância de massa original de 1,0 Da e uma tolerância de íons fragmentos EM/EM de 0,5 Da para criar espectros de consenso. Além disso, os espectros de consenso que continham menos de 2 espectros foram descartados. Uma rede molecular foi então criada onde as *edges* foram filtradas para ter uma pontuação de cosseno acima de 0,65 e mais de 4 picos emparelhados. Outras *edges* entre dois *nodes* foram mantidas na rede se, e somente se, cada um dos *nodes* apareceu nos respectivos 10 principais *nodes* mais comuns. Os espectros na rede foram então pesquisados contra as bibliotecas espectrais do GNPS. Os espectros da biblioteca foram filtrados da mesma maneira que os dados de entrada. Todas as comparações mantidas entre os espectros de rede e os espectros da biblioteca foram obrigados a ter uma pontuação acima de 0,65 e pelo menos 4 picos combinados. (WANG *et al.*, 2016) As redes moleculares espectrais criadas no GNPS foram importadas para o software Cytoscape 3.4 e visualizadas usando o layout FM3 e estão disponíveis em (inserir os endereços). Os *nodes* representam as massas dos íons precursores e a espessura de *edges* correspondem ao escores de cosseno. Grupo e arquivos de atributos e curvas de consenso cumulativo foram gerados de acordo com as documentações do GNPS ([https://bix-lab.ucsd.edu/Exibir / Public / GNPS + Documentação + Página](https://bix-lab.ucsd.edu/Exibir/Public/GNPS+Documentação+Página)).

Os picos cromatográficos foram identificados com base em seus espectros de massas, massa obtida para os íons precursores (molécula protonada $[M+H]^+$ e/ou molécula desprotonada

A determinação da concentração de amostra ou padrão que causa 50% de inibição da concentração (CE_{50}) inicial de DPPH foi obtida por regressão linear dos pontos plotados graficamente. Para a plotagem dos pontos, foram utilizados os valores das médias obtidas de triplicatas realizadas para cada uma das substâncias.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste tópico serão apresentados e discutidos os resultados obtidos neste trabalho, sendo primeiramente apresentado os resultados farmacológicos e posteriormente os resultados químicos.

6.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA *IN VIVO* E ANTIOXIDANTE

Neste tópico estão descritos e discutidos os resultados da avaliação farmacológica e da atividade antioxidante apresentados nesta dissertação.

6.1.1 Ensaio de hiperalgesia induzida por formalina

O extrato bruto foi avaliado nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg p.o. e mostrou atividade antinociceptiva em comparação com o controle (veículo) na primeira e na segunda fase ($p < 0,001$). A Figura 11 mostra o tempo de lambida dos animais após o tratamento com o veículo, extrato bruto e ou medicamentos padrão na primeira e na segunda fase do teste de formalina. Em relação à primeira fase, pode-se observar que o extrato bruto foi bastante ativo em todas as doses, reduzindo o tempo de lambida em relação ao grupo de animais tratados com o veículo ($p < 0,001$). No mesmo sentido, a morfina (3 mg/kg), utilizada como controle positivo, também reduziu o tempo de lambida em relação ao grupo do veículo ($p < 0,001$). Como esperado, a indometacina não teve efeito na primeira fase, chamada neurogênica, do teste de formalina ($p > 0,05$). Em relação à segunda fase, chamada fase inflamatória, o tratamento com extrato bruto, frações, morfina e indometacina nas doses testadas reduziu o tempo de lambida em relação ao grupo do veículo ($p < 0,05$).

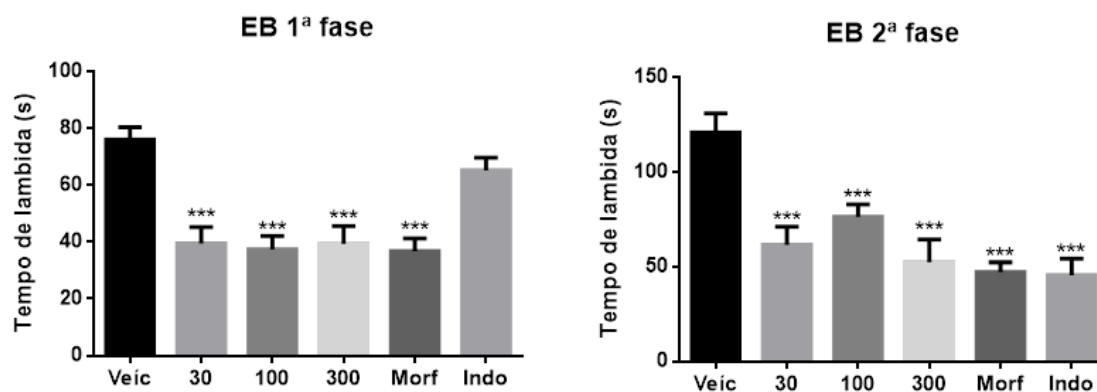


Figura 11 - Efeito do extrato bruto de *Dillenia indica* L. administrado via oral em camundongos *Swiss* sobre o tempo de lambida no teste formalina. Os animais foram tratados oralmente com o veículo, EB (doses 30, 100 e 300 mg/kg), indometacina (Indo: 10 mg/kg) ou morfina (Morf; 3mg/kg). Cada coluna representa a média com S.E.M. para doze camundongos cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância (*One Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Newman-Keuls*): *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (veículo).

Fonte: Do autor

As frações de acetato de etila, hidroalcoólica e hexânica, nas doses de 3, 10 e 30 mg/kg p.o., tiveram uma atividade antinociceptiva em comparação com o controle (veículo) na primeira fase ($p < 0,001$), evidenciado pela redução do tempo de lambida (Figura 12). No mesmo sentido, a morfina também reduziu o tempo de lambida em relação ao grupo do veículo ($p < 0,001$), no entanto, a indometacina não teve efeito na primeira fase do teste de formalina ($P > 0,05$). Em relação a segunda fase os animais tratados com as frações também tiveram redução do tempo de lambida em relação ao grupo do veículo ($p < 0,05$), revelando também um possível efeito sobre a fase inflamatória. Como controle positivo, um grupo de animais foi tratado com morfina, fármaco de referência que reduziu a quantidade de lambidas dos animais na primeira e na segunda fase após a injeção de formalina ($p < 0,001$) (Figuras 12 e 13). Já a indometacina, inibiu o tempo de lambida apenas na segunda fase do teste (Figura 13). Desta forma, pode-se concluir que as três frações tiveram ação antinociceptiva, surpreendentemente, muito similares.

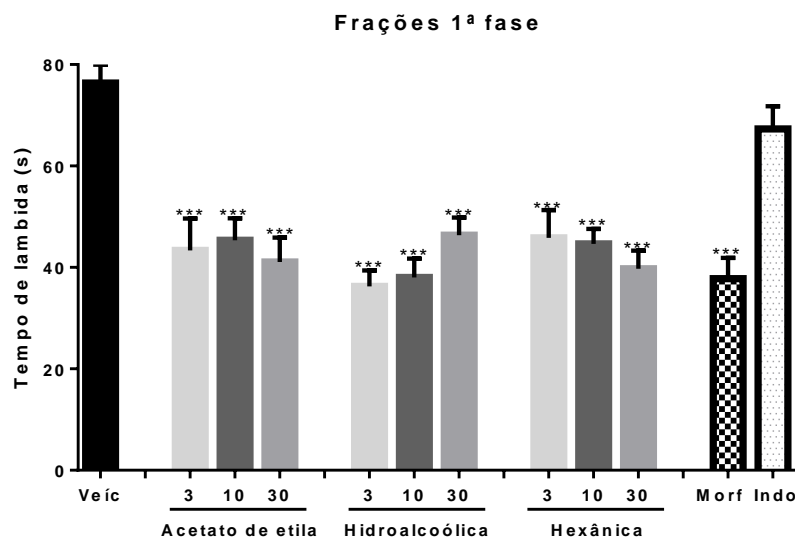


Figura 12 - Efeito das frações de *Dillenia indica* L. administrado via oral em camundongos *Swiss* sobre o tempo de lambida na primeira fase no teste formalina. Os animais foram tratados oralmente com o veículo, 3 frações (doses 3, 10 e 30 mg/kg), indometacina (Indo: 10 mg/kg), morfina (Morp; 3mg/kg). Cada coluna representa a média com S.E.M. para oito camundongos em cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância (*One Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Newman-Keuls*): *** $p < 0,001$ quando comparado com o grupo controle (veículo).

Fonte: Do autor

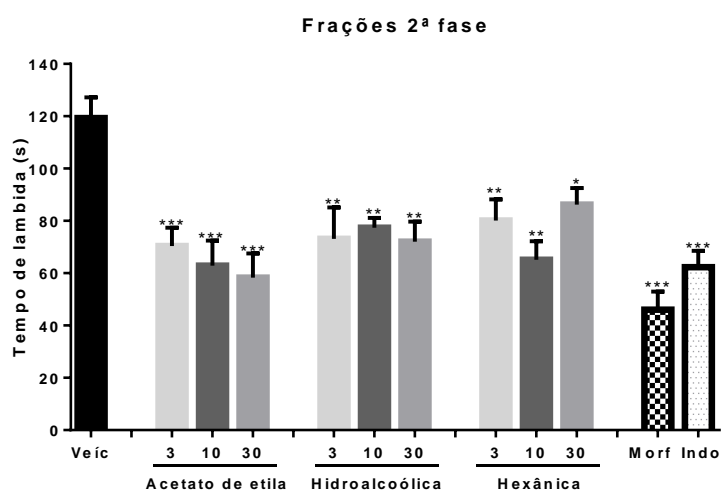


Figura 13 - Efeito das frações de *Dillenia indica* L. administrado via oral em camundongos *Swiss* sobre o tempo de lambida na segunda fase no teste formalina. Os animais foram tratados oralmente com o veículo, 3 frações (doses 3, 10 e 30 mg/kg), indometacina (Indo: 10 mg/kg), morfina (Morp; 3mg/kg). Cada coluna representa a média com S.E.M. para oito camundongos em cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância (*One Way ANOVA* seguido do pós-teste de *Newman-Keuls*): *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,1$ quando comparado com o grupo controle (veículo).

Fonte: Do autor.

A injeção de formalina produz uma resposta comportamental bifásica em que a primeira fase (0-5 minutos) caracteriza-se pela ocorrência de dor neurogênica por estimulação direta das

terminações aferentes nociceptivas e a segunda fase (15-30 minutos) é caracterizada por inflamação periférica e envolve um período de sensibilização durante o qual o processo inflamatório ocorre (TJOLSEN et al., 1992). Os fármacos que atuam principalmente como analgésicos centrais inibem ambas as fases, enquanto os fármacos de atuação periférica inibem apenas a segunda fase (ABRAM E OLSON, 1994; MANNING, 1998; ROSLAND et al., 1990; YAMAMOTO et al., 2002; YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 2002). Uma vez que a hipernocicepção comportamental da primeira e segunda fase foi afetada pelo tratamento com o extrato bruto e suas frações, pode-se sugerir que não só o efeito antinociceptivo, mas também a atividade anti-inflamatória podem estar presentes.

6.1.2 Campo Aberto

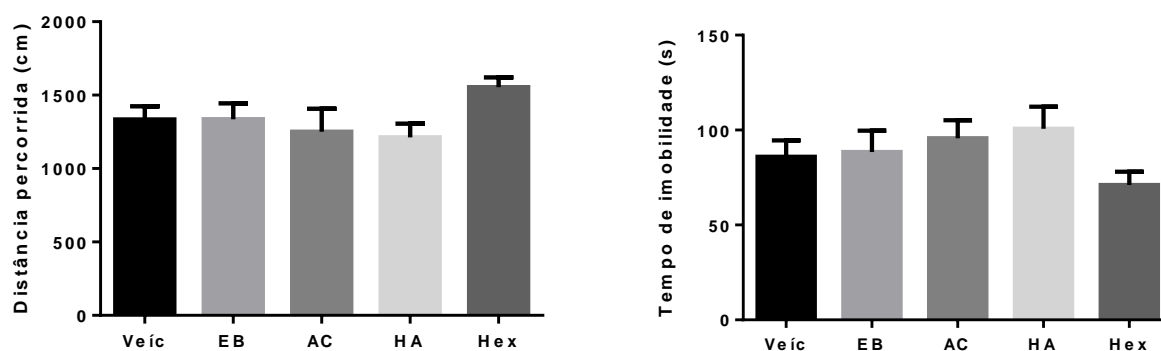


Figura 14 - Gráfico de distância percorrida (cm) e tempo de imobilidade (s).
Fonte: Do autor.

O ensaio de campo aberto foi realizado para avaliar algum possível efeito sedativo ou sobre a locomoção, comum em fármacos de ação central, a exemplo da morfina. A Figura 14 mostra a distância percorrida pelos animais, em centímetros, e o tempo de imobilidade, no aparato de campo aberto após ter sido tratados com veículo, a maior dose do extrato bruto (300 mg/kg) ou a maior dose das frações (30 mg/kg). Os resultados obtidos indicam que não houve diferença na distância percorrida e no tempo de imobilidade entre os grupos experimentais em relação ao grupo do veículo ($p > 0,05$), sugerindo, então, que o extrato e suas frações não alteraram a atividade locomotora e exploratória dos animais.

6.1.3 Avaliação do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo

Para avaliar a possível participação dos sistemas opioide e canabinoide na atividade antinociceptiva do extrato e das frações, os animais foram pré-tratados com veículo, naloxano (antagonista opioide) ou AM251 (antagonista canabinoide) e também foram submetidos ao teste de formalina (Figura 15).

A análise dos resultados na primeira fase do teste (Figura 15A), revelaram que os animais que foram tratados com o extrato bruto (30 mg/kg), com as frações (3 mg/kg) ou fármacos padrões (morfina 3 mg/kg e WIN55,212-2 1 mg/kg) tiveram o tempo de lambida reduzido em relação ao grupo de animais pré-tratados e tratados com veículo ($p < 0,001$). O pré-tratamento com naloxano inibiu a atividade antinociceptiva, evidenciado pela redução do tempo de lambida, em animais que foram tratados com extrato bruto ($p < 0,01$) e morfina ($p < 0,001$) quando comparados aos respectivos grupos pré-tratados com veículo. Além disso, o pré-tratamento com AM251 inibiu a atividade antinociceptiva do extrato bruto ($p < 0,05$), das frações de acetato de etila ($p < 0,05$) e hexânica ($p < 0,01$) bem como o fármaco padrão utilizado, WIN55,212 -2 ($p < 0,01$) quando comparado ao respectivo grupo pré-tratado com o veículo.

Em relação à segunda fase (Figura 15B), animais que foram tratados com o extrato bruto (30 mg/kg), com as frações (3 mg / kg) ou fármacos padrões (morfina 3 mg / kg e WIN55,212-2 1 mg / kg) tiveram o tempo de lambida reduzido em relação ao grupo de animais pré-tratados e tratados com veículo ($p < 0,05$). O pré-tratamento com naloxano inibiu apenas a atividade antinociceptiva da morfina ($p < 0,01$) quando comparado ao respectivo grupo pré-tratado com o veículo. Além disso, o pré-tratamento com AM251 inibiu a atividade antinociceptiva do extrato bruto ($p < 0,05$), das frações de acetato de etila ($p < 0,01$) e hidroalcoólica ($p < 0,05$), bem como do medicamento padrão usado WIN55,212 -2 ($p < 0,001$) quando comparado ao respectivo grupo pré-tratado com o veículo.

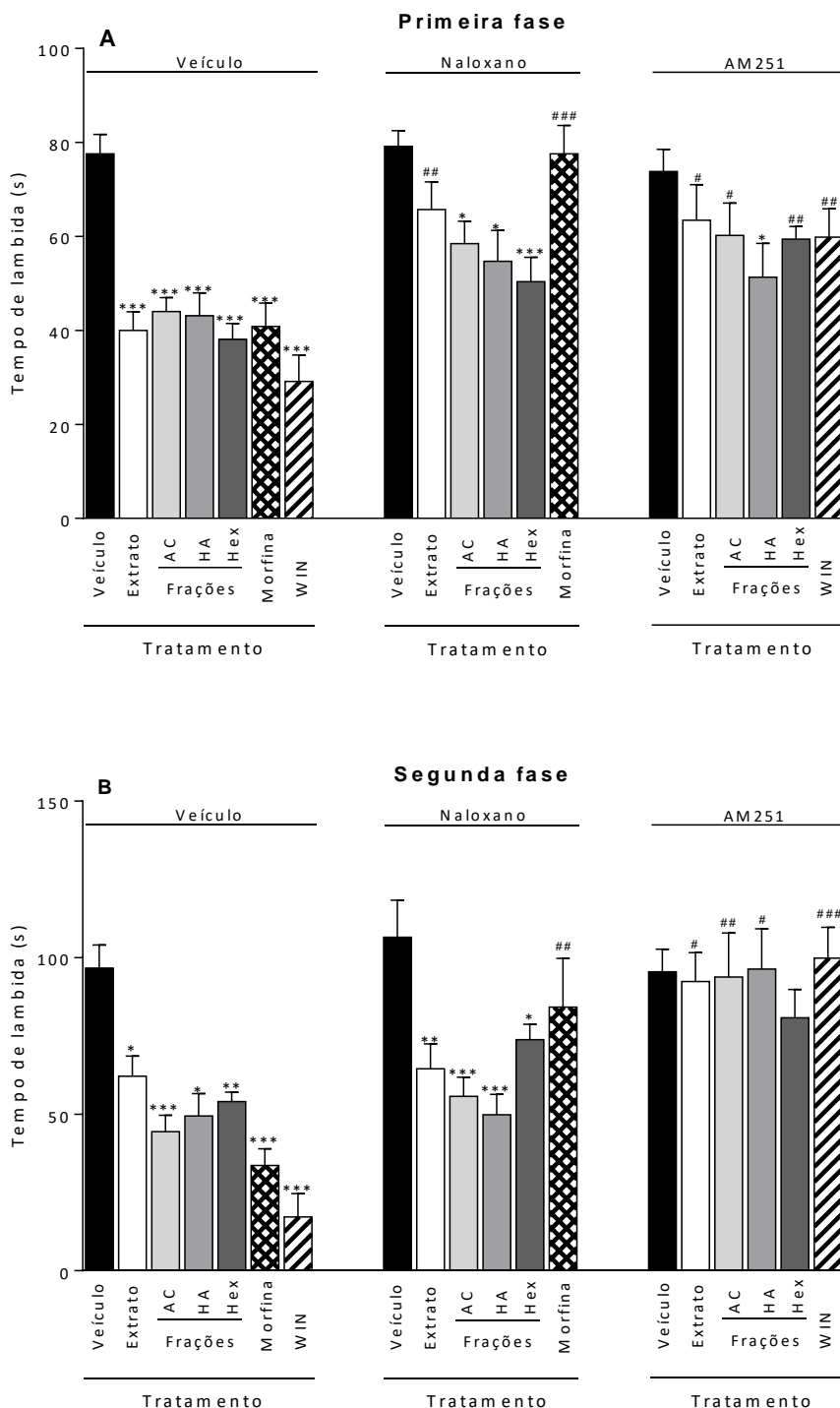


Figura 15 - Efeito do pré-tratamento com o antagonista do receptor de opioides não seletivo naloxano (1 mg/kg; i.p.) ou antagonista do receptor CB1 AM251 (3 mg/kg; i.p.) administrado 15 min antes dos tratamentos com extrato bruto (30 mg / kg, p.o.), as frações de acetato de etila (AC), hidroalcoólica (HA) e hexânica (Hex) (3 mg / kg, p.o.) na primeira (Figura 15A) e segunda fase (Figura 15B) do teste de formalina. Cada coluna representa a média com S.E.M. por sete a nove ratos em cada grupo. Os símbolos indicam os níveis de significância: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparados com o grupo controle (veículo); # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$ e ### $p < 0,001$ quando comparado ao respectivo grupo pré-tratado com o veículo.

Fonte: Do autor.

A partir desses resultados foi possível verificar a participação dos sistemas opioide e canabinoide na atividade antinociceptiva tanto do extrato bruto de *Dillenia indica*, como de suas frações. Para isso, utilizamos o naloxano, antagonista do receptor de opioide não seletivo e AM251, um antagonista do receptor CB1. Os dados obtidos mostraram que a administração de naloxano, um antagonista do receptor de opioide, levou à inibição do efeito antinociceptivo do extrato bruto e de suas frações, na primeira fase do teste de formalina. Além disso, o pré-tratamento com AM251, antagonista do receptor CB1, inibiu a atividade antinociceptiva do extrato bruto e quase todas as frações testadas na primeira e segunda fases do teste de formalina.

Uma vez que o naloxano interage com os receptores opioides μ , κ e δ , os dados obtidos sugerem a participação desses receptores no efeito antinociceptivo apenas do extrato bruto. Vários estudos demonstraram interações recíprocas entre sistemas opioide e canabinoide, sugerindo um mecanismo subjacente comum (PACHECO et al., 2016). Este é um ponto interessante já que o AM251 também inibiu o efeito antinociceptivo induzido pelo extrato bruto. Por exemplo, o canabinoide, Δ^9 -tetra-hidrocanabinol, produz um aumento na antinocicepção da morfina induzindo a liberação da dinorfina aditiva endógena (WELCH; EADS, 1999). Por outro lado, a administração do antagonista do receptor CB1, AM251, inibe a antinocicepção induzida pela morfina (DA FONSECA et al., 2008, PACHECO et al., 2009). A sinergia nos efeitos analgésicos destes compostos é atribuída a uma interferência entre estas duas vias de sinalização mediadas pela ativação simultânea de receptores opioides e canabinoides (CICHEWICZ, 2004).

Quanto ao efeito antinociceptivo das frações do extrato bruto, os resultados demonstram que esse efeito é mediado pelo sistema canabinoide, mas não pelo sistema opioide. Nos últimos anos, o sistema endocanabinoide tem sido muito estudado para obter-se analgesia através de ligantes canabinoides, porém, sem o seu efeito psicotrópico (SEGARCEANU et al., 2014). As propriedades analgésicas do sistema endocanabinoide também foram demonstradas para outros fármacos utilizados extensivamente para o tratamento da dor, como paracetamol, ibuprofeno e indometacina (BARRIERE et al., 2009; HOLT et al., 2007; MALLET et al., 2008; OTTANI et al., 2006). O receptor CB1 parece estar envolvido em efeitos analgésicos e outras respostas, possivelmente por inibição da atividade da enzima adenilato ciclase (COMPTON et al., 1992; DEVANE et al., 1988). Em nosso estudo, mostramos evidências de que o receptor CB1 está implicado no efeito antinociceptivo induzido pelas frações de *Dillenia indica*.

6.1.4 Ensaio de toxicidade aguda

Tabela 1 – Resultados ensaio de toxicidade

Parâmetros avaliados	Resultados
Aspectos visuais das fezes e urina	Normais
Perda de peso e pelo	Não houve
Movimentos repetitivos	Não apresentaram
Exploração da caixa moradia	Aparentemente normal

Fonte: Do autor.

A avaliação da toxicidade aguda do extrato bruto (300 mg/Kg) e de suas frações (30 mg/Kg) foi realizada pela observação da urina, perda de peso e pelo e de parâmetros comportamentais. Todos os parâmetros avaliados estão descritos na tabela 1. Os animais foram observados durante dois diferentes períodos do dia (manhã e tarde) durante 1 hora em sua caixa moradia e nenhum apresentou sintoma alterado, não houve também a morte de nenhum animal. Diante destes resultados foi possível caracterizar que nem o extrato bruto, nem suas frações, nas maiores doses teste, apresentaram efeitos tóxicos aos animais. Deste modo, não houve necessidade de realizar o teste com doses menores, pois, a maior dose administrada já mostrou segurança terapêutica.

É importante salientar que a ausência dos efeitos tóxicos não é surpreendente, uma vez que, na Índia é comum a utilização dos frutos de *D. indica* para preparação de bebidas medicamentosas além de uso na culinária, a população come os frutos e usam para o preparo de sucos e geleias, o que evidencia a ausência de toxicidade oral em humanos (LIMA et al., 2014)

6.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Neste tópico estão descritos e discutidos os resultados farmacológicos da dissertação.

6.2.1. ATIVIDADE SEQUESTRANTE DE DPPH

A capacidade sequestrante de radicais DPPH do extrato e suas frações de *D. indica* foram determinados isoladamente. Neste ensaio, leva-se em consideração o grau de descoloração e sua intensidade, como indicativos do potencial de inibição de radicais livres, que é consequência da redução do radical DPPH (púrpura) que se converte na hidrazina (amarelo) correspondente (Figura 10).

Os resultados obtidos para o extrato e frações da *D. indica* foram expressos em CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) da capacidade sequestrante de radicais livres – DPPH (Figura 20), os quais foram comparados com os dados dos antioxidantes de referência, ácido ascórbico e quercetina. Estes valores de CE_{50} ($\mu\text{g.L}^{-1}$) foram avaliados estatisticamente ao nível de significância de 5%, utilizando análise de variância (ANOVA). Os resultados obtidos (Figura 26) revelaram que as maiores atividades sequestrante de radicais livres – DPPH foram do extrato bruto ($CE_{50} = 11,70$ mg/mL) e da fração acetato de etila ($CE_{50} = 10,77$ mg/mL), seguidos da fração hidroalcoólica ($CE_{50} = 78,36$ mg/mL) e fração hexânica ($CE_{50} = 278,70$ mg/mL). No entanto, nenhum dos extratos avaliados foram mais ativos que os compostos de referência ácido ascórbico ($CE_{50} = 1,123$ mg/mL) e quercetina ($CE_{50} = 1,54$ mg/mL).

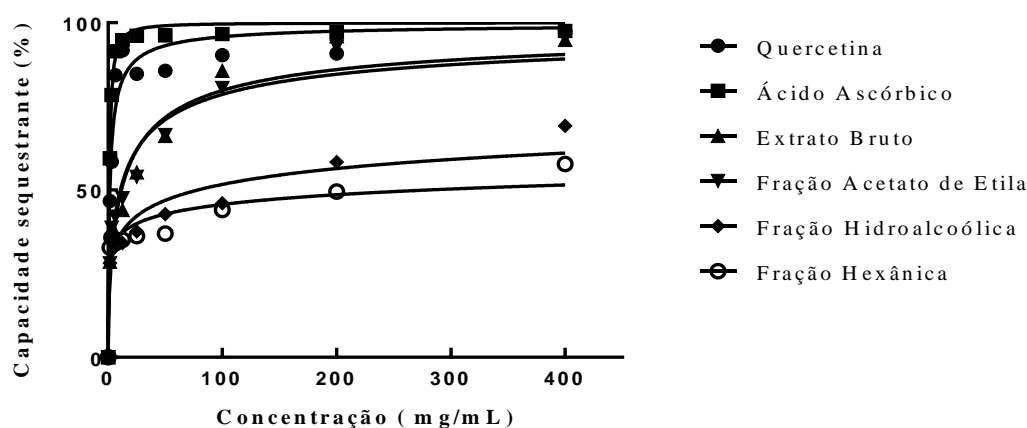


Figura 28 - Atividade antioxidante do extrato bruto e frações pelo teste de Sequestro de Radical DPPH. Fonte: Do autor.

No ensaio da atividade sequestrante de DPPH, o extrato bruto e a fração acetato de etila foram equipotentes na capacidade sequestrante de radicais, em relação aos padrões positivos utilizados, como a quercetina e o ácido ascórbico. Este resultado pode ser atribuído à presença de flavonoides e outros compostos fenólicos, reconhecidamente antioxidantes em virtude de

suas estruturas com núcleos aromáticos substituídos por grupamentos hidroxilas livres, muitos do tipo catecólico, justificando a maior a capacidade sequestrante de radicais livres do extrato e da fração acetato de etila, comparado com as demais frações, menos ricas neste tipo de constituinte.

6.3 PERFIL QUÍMICO: ESTUDO DE DESREPLICAÇÃO POR IDENTIFICAÇÃO E ANÁLISE DOS PICOS CROMATOGRÁFICOS

Os picos cromatográficos do extrato bruto e de suas frações acetato de etila e hidroalcoólica foram analisadas de maneira convencional, ou seja, os picos com maiores intensidades foram tabelados, manualmente, um a um, e posteriormente comparados com a literatura, visando um estudo de desreplicação. Foram analisadas a m/z do íon no modo negativo, através de seu MS (m/z) e MSMS (m/z) e também no modo positivo. Entretanto, este segundo modo apresentou uma quantidade menor de picos, e por isso, alguns picos e fragmentos encontrados no modo negativo não foram identificados no modo positivo. Por conseguinte, levando em consideração a maior quantidade de picos e fragmentos, o modo negativo foi utilizado para a identificação das análises e também para gerar redes moleculares através do *software* GNPS, que ajudou a validar a técnica utilizada e agrupar os metabólitos secundários por classes químicas.

A seguir serão apresentados as tabelas e os cromatogramas do extrato bruto de *D. indica* e de suas frações.

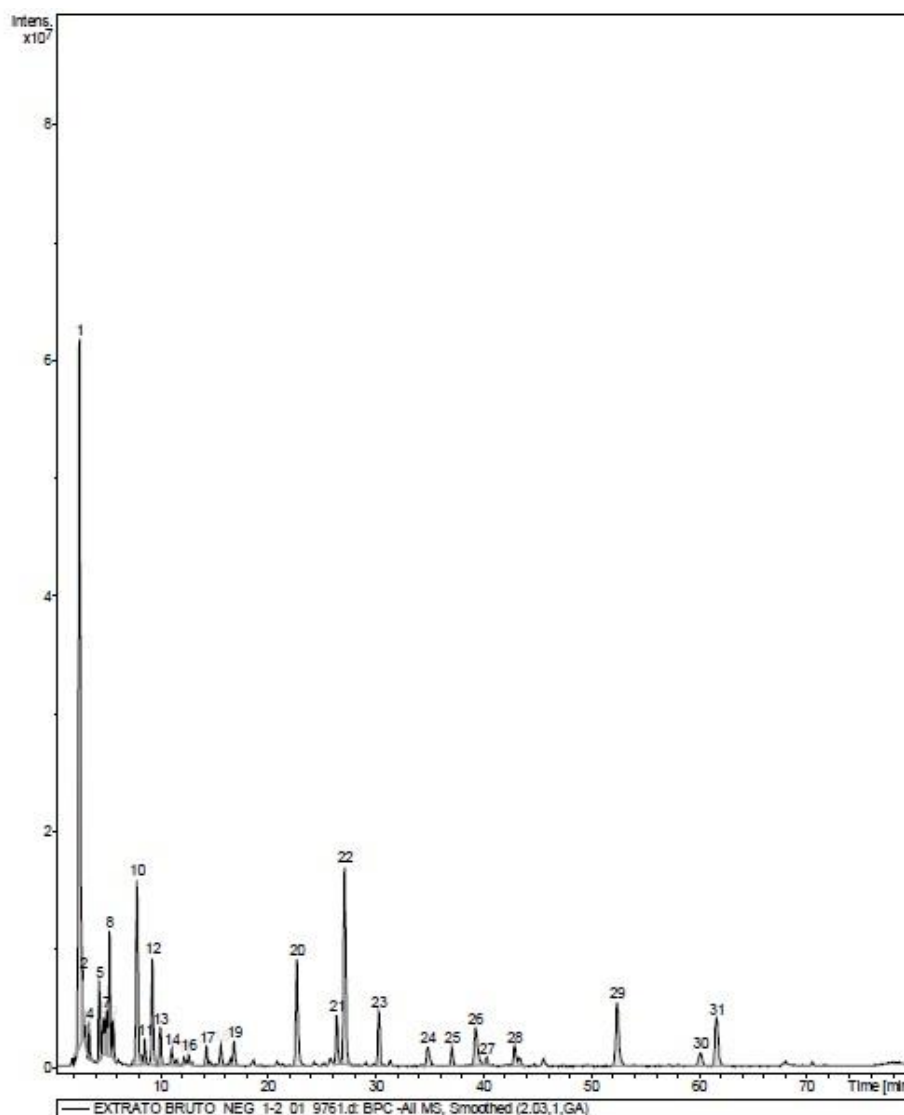


Figura 16 - Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo do Extrato Bruto de *Dillenia indica* Lin.

Fonte: Do autor.

Tabela 2 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EMEM no extrato bruto dos frutos de *Dillenia indica* Lin.

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	UV Max nm
1	Ácido cefeoilmálico (19)	2,6	591	178,93; 216,93; 294,95	1.4	279	127,05 ; 197,01, 261,04	200
2		3.2	374	300,99	1.4	323	114,95; 160,94; 206,98; 249,00; 270,91; 305,01; 322.06 ; 404,92	200
3	Ácido protocatéquico- 4-glicosídeo (20)	3.5	307	127,01; 163,01; 289,08	1.4	315	278,96; 296,96; 315,01 ; 271,06, 305,13	200; 266
4	Ácido rosmarínico (21)	4.4	323	185,00 ; 305,09	1.4	359	124,95; 152,91 ; 178,89; 289,99; 314,99; 340,95;	204; 290
5		4.8	467	202,97; 287,10; 347,12; 449,15	1.4	433	130,88; 160,97; 219,06; 237,00 ; 280,86; 304,81; 329,04; 373,02; 397,04; 406,01; 425,14	205; 278
6		5.1	[M + H] ⁺ 525	363,06	1.4	523	170,96; 242,93; 270,81; 314,93; 360,96; 386,90; 430,90; 477,00	204
7	Ácido caprilíco (22)	5.4	301	156,97; 185,00 ; 282,95; 226,99	1.4	143	71,07 ; 96,80; 114,91; 142,95	204; 284
8	Ácido octadenóico (23)	5.8	185	86,15; 141,03; 166,97; 201,02; 246,12; 316,93; 360,00; 469,99	1.4	219	110,92; 172,89	204; 285
9		7.9	397	184,98; 235,02; 311,04; 353,05 ; 379,07	1.4	613	372,02; 502,13; 577,10	204; 279
10		8.6	382	164,00; 220,08 ; 326,09	1.4	373	166,97; 210,97; 329,02	207
11		9.3	482	211,04 ; 329,03; 391,15; 463,16	1.4	289	204,98; 244,97	204; 211
12		10.1	211	70,16; 183,06 ; 209,05; 311,18; 346,40; 383,24; 409,25; 482,12	1.4	453	152,77; 208,65; 268,62; 297,94 ; 405,83	204; 210

Tabela 2 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EMEM no extrato bruto dos frutos de *Dillenia indica* Lin. (continuação)

13		11.2	306	233,88; 289,07 ; 424,31; 605,40	1.4	720	288,89; 413,08; 492,01; 546,64; 635,59 ; 693,05	204; 213
14		12.3	257	89,09; 185,01 ; 239,14	1.4	576	289,01 ; 482,77; 508,90	209; 213
15	Isoramnetina ramnose (24)	12.7	211	86,14; 155,14; 183,07 ; 229,80; 280,09; 333,21; 422,05	1.4	517	323,03 ; 471,10	214
16		14.4	579	247,02; 291,06; 409,07 ; 561,20	1.4	343	180,95	214
17		16.8	211	86,15; 119,08; 151,01; 196,03 ; 249,99; 316,99; 373,21	1.4	477	300,94	216
18		22.8	625	193,03; 287,01; 463,08; 535,22; 607,11	1.4	499	243,07; 300,96; 322,93 ; 394,87; 498,33	216
19		26.4	338	135,10; 226,14; 303,29	1.4	491	180,84; 328,01 ; 370,99; 463,08	217
20		27.2	577	244,96; 425,08 ; 539,99	1.4	483	146,81; 188,93; 196,89; 206,92; 284,92 ; 306,90; 376,93; 422,94; 483,01	217
21	Diosmetin-6- C-hexose (25)	30.3	211	86,13; 151,03; 183,06 ; 268,21; 311,21; 373,05; 426,17	1.4	461	298,00 ; 341,01; 433,06	218
22		34.9	211	96,09; 127,12; 183,07 ; 284,02; 343,15; 377,96; 414,71; 477,95; 498,62	1.4	467	204,88; 357,03; 430,92 ; 327,97; 386,94	219
23		37.0	338	108,94; 163,08; 226,20; 268,19; 303,26 ; 370,71; 445,04	1.4	489	284,95	219
24	Caempfenol-3- O-acetil hexose (26)	39.2	287	199,12; 269,15 ; 163,07	1.4	379	298,99	220

Fonte: Do autor

No extrato bruto foram identificados 31 picos de boa intensidade, que foram todos tabelados e, em comparação com dados da literatura, levaram à identificação de oito substâncias. Dentre os picos identificados, merece destaque o pico 1 com m/z igual a 591 relativo ao ácido cafeoilmálico, que será discutido posteriormente.

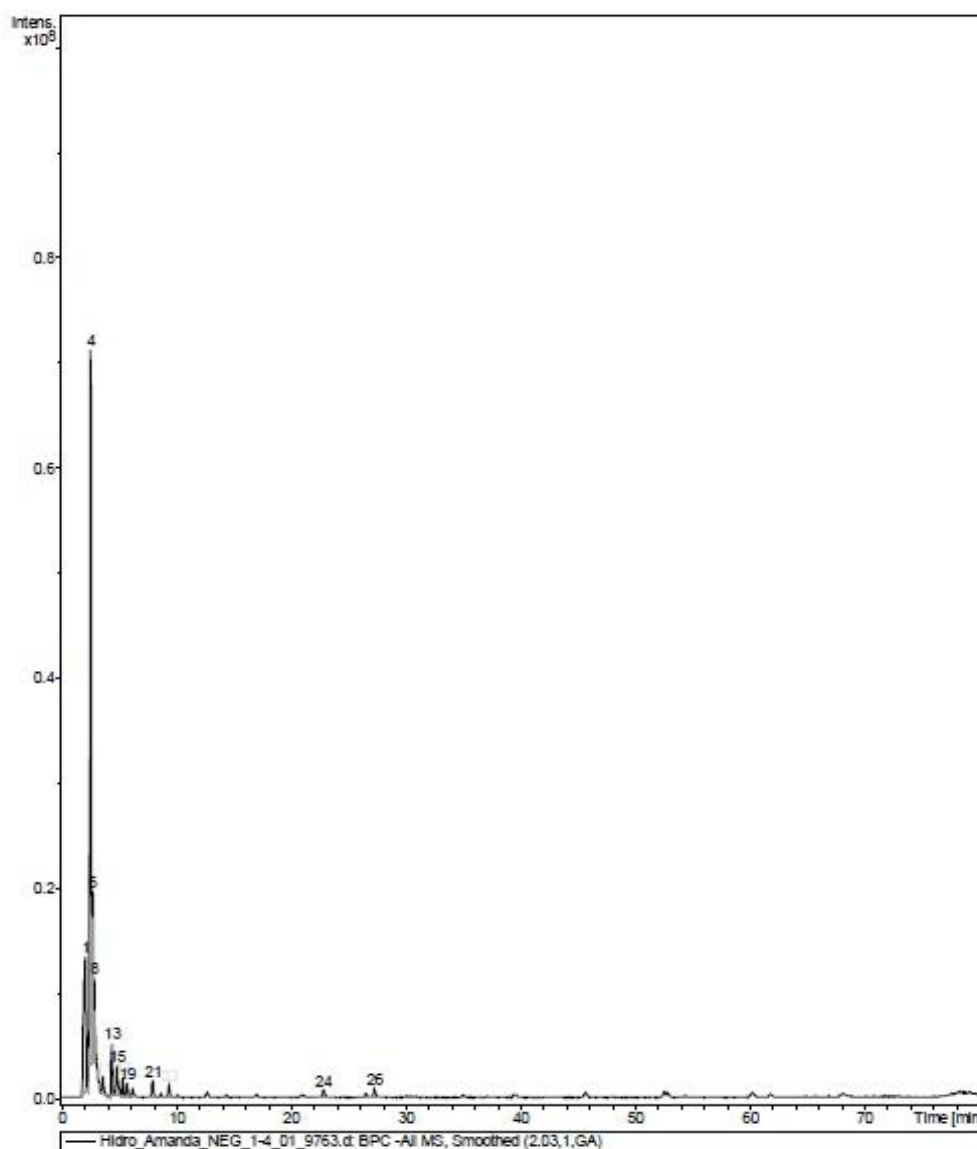


Figura 17 - Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo da fração hidroalcoólica.

Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EM/EM na fração hidroalcoólica dos frutos de *Dillenia indica* Lin.

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	UV Max nm
1		2,1	375	323,09 ; 412,90; 453,07; 524,88; 641,87	1.4	387	272,90	200
2		2,6	261	89,04; 126,99; 215,01; 243,04	1.4	393	294,95; 234,84	200
3		2,8	243	102,13; 196,98 ; 302,17; 424,28	1.4	97	-	213
4		2,9	293	99,04; 126,98; 149,01; 159,99; 257,03 ; 275,03	1.4	509	294,96; 411,04	205
5		3,7	307	117,07; 163,01; 219,96; 259,92; 289,05	1.4	413	161,00; 238,81; 292,87 ; 314,94; 367,05	202
6		4,4	671	219,03; 381,12	1.4	457	234,87; 258,90; 358,98 ; 367,05	202
7		4,9	467	202,94; 287,12; 347,13; 449,13	1,4	443	124,97; 160,80; 237,02; 262,97; 328,99; 374,87; 425,07; 438,96	202,282
8		5,4	525	363,02	1.4	143	70,96 ; 96,87; 142,89; 228,96; 260,83; 407,09	204
9	Ácido glucônico (27)	5,8	614	207,99; 291,09; 361,16 ; 487,28	1.4	329	208,95; 238,94	204
10		6,2	763	311,03; 313,05; 383,05; 441,06; 473,13 ; 473,13; 503,12; 521,10; 611,14; 643,16; 673,16	1.4	740	232,96; 316,96; 329,03; 359,07; 389,11; 451,09; 497,07 ; 569,05; 617,37; 649,16; 679,15; 721,15	206

Fonte: Do autor.

Na fração hidroalcoólica poucos picos de boa intensidade foram tabelados, apesar de uma maior quantidade de picos numerados no cromatograma, devido às suas baixas intensidades. Esta fração, comparada com o extrato fruto e com as frações acetato de etila e hexânica, demonstrou ter o menor número de metabólitos.

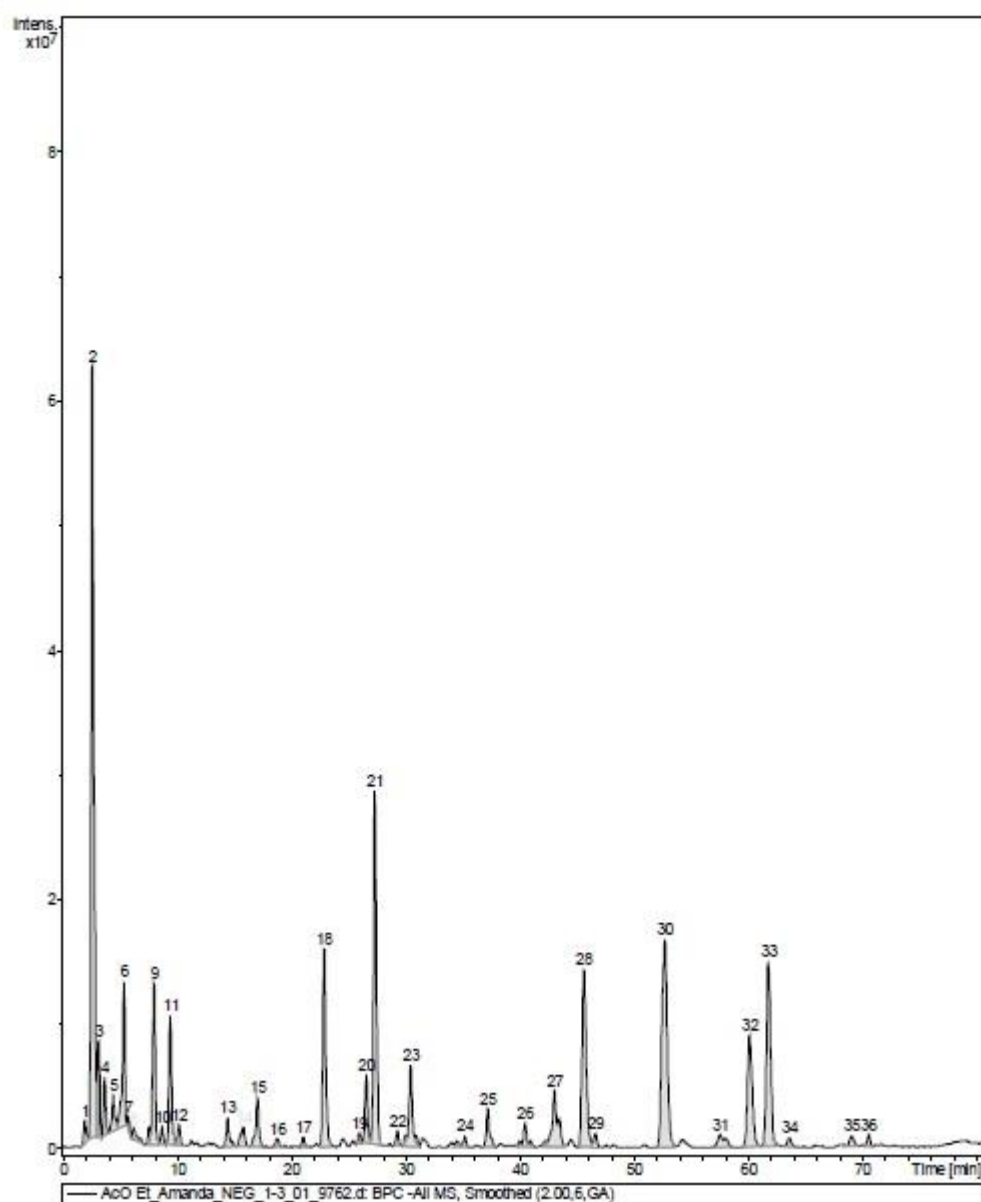


Figura 18 - Cromatograma de pico base (BPC) no modo negativo da fração AcOEt.

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EM/EM na fração acetato de etila dos frutos de *Dillenia indica* Lin.

#Sinal	Substâncias	t.r. (min)	(IES ⁺) Íon Precursor	(IES ⁺) EM/EM (m/z)	Erro PPM	(IES ⁻) Íon Precursor	(IES ⁻) EM/EM (m/z)	UV Max nm
1	Ácido cafeoilmálico (19)	2,6	260	99,04; 126,99; 214,97; 242,99	1.4	591	294,96	200
2		3,2	273	97,06; 81,12; 156,98 ; 254,97	1.4	347	132,90; 248,90	200; 258
3		3,7	347	184,00 ; 287,05; 329,07	1.4	471	146,91 ; 232,97; 263,02; 232,01; 437,80	204
4		4,5	463	157,01; 184,98 ; 228,98; 301,01; 347,07, 403,08; 445,07	1.4	439	132,92; 160,97 ; 232,97; 276,97; 232,04; 392,97	289
5		5,4	160	71,04; 114,90; 142,92	1.4	363	218,98; 345,03	204
6		5,8	209	110,96; 166,90; 172,85 ; 283,14; 365,90	1.4	243	168,99; 196,95 ; 224,96	204
7		6,2	739	286,94; 329,99; 358,97 ; 449,05; 479,04; 619,14; 679,21; 722,15	1.4	301	156,96; 184,97 ; 212,97; 283,02	204
8		8,7	409	329,09; 373,07	1.4	452	161,02; 207,06; 361,14	206; 210
9		9,4	325	289,00	1.4	199	112,02; 181,02	204
10		10,2	887	245,04; 272,99; 417,07; 447,03; 470,99; 599,09 ; 642,05; 735,14; 825,12; 869,18; 910,12	1.4	491	185,02; 256,99 ; 329,04; 403,13; 473,13	205
11		14,4	343	180,94	1.4	383	132,08; 138,94; 220,93; 271,06 ; 346,24	215; 282
12		15,8	613	424,95; 577,10	1.4	210	156,24; 184,21; 196,02	213

Tabela 4 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EM/EM na fração acetato de etila dos frutos de *Dillenia indica* Lin. (continuação)

13	Quercetina-3- <i>O</i> -glucoronídeo (28)	17,1	477	300,91	1.4	211	86,16; 183,08	213
14		18,8	435	315,03	1.4	213	86,23; 184,12	214
15	Isoramnetin-3- <i>O</i> -glicosídeo (29)	21,1	477	150,86; 171,90; 269,98; 285,96; 313,95 ; 356,97	1.4	262	102,12; 200,17	219
16		22,9	499	190,90; 238,90; 300,91 ; 322,87; 415,17; 452,05; 482,71	1.4	501	325,01	219
17	Caempfenol-3- <i>O</i> -hexose (30)	26,0	477	284,97	1.4	227	104,96; 156,88 ; 172,99	221
18		26,6	491	327,96 ; 371,02; 401,02; 463,08	1.4	211	86,12; 151,02; 183,28	217; 221
19		27,3	461	284,94	1.4	507	147,99; 331,02 ; 394,21	219; 270
20		29,3	461	284,94; 422,96	1.4	571	220,05; 287,03 ; 359,92; 452,21; 536,02	221
21		30,5	519	271,06; 356,72; 402,11; 461,02	1.4	347	201,03; 257,03; 287,05; 329,16	222
22	Caempfenol-3- <i>O</i> - glucoronídeo (31)	35,2	461	298,98 ; 340,99	1.4	246	106,10; 228,21	222
23	Caempfenol-3- <i>O</i> - acetil hexose (26)	37,2	489	284,96	1.4	718	226,93; 322,99; 382,96; 429,06; 453,05; 535,01 ; 585,62; 624,24; 698,88	223
24	Naringenina (32)	40,5	271	150,90 ; 176,88; 270,94	1.4	237	219,13	223
25	Ácido protocateicuico- <i>O</i> -hexose (33)	43,1	315	299,94	1.4	362	157,12 ; 218,94; 261,00; 345,00	223

Tabela 4 - Metabólitos detectados por CLAE-DAD-EM/EM na fração acetato de etila dos frutos de *Dillenia indica* Lin. (continuação)

26		45,6	453	385,15	1.4	230	85,14; 130,06; 174,07; 212,20	220
27	Ácido cafeoil- 5-O-quínico (34)	69,1	530	264,82; 367,12 ; 414,88; 482,72	1.4	338	111,10; 149,08; 177,10; 247,14	225

Fonte: Do autor.

A fração acetato de etila foi a que apresentou maior quantidade de picos de boa intensidade. Do total de 35 picos tabelados, 8 diferentes substâncias foram identificadas de acordo com a literatura disponível. Dessas 8 substâncias identificadas, pode-se notar que 2 delas, a quercetina-3-O-glucuronido e isoramnetin-3-O-glucósido, apresentaram o mesmo íon precursor, m/z 477 e foram diferenciadas através dos fragmentos gerados.

A seguir estão os 2 espectros de UV, MS e MSMS das substâncias. A identificação foi possível devido a diferente fragmentação, cada metabólito diferente mesmo partindo de um mesmo íon precursor gera íons produtos (fragmentos) diferentes.

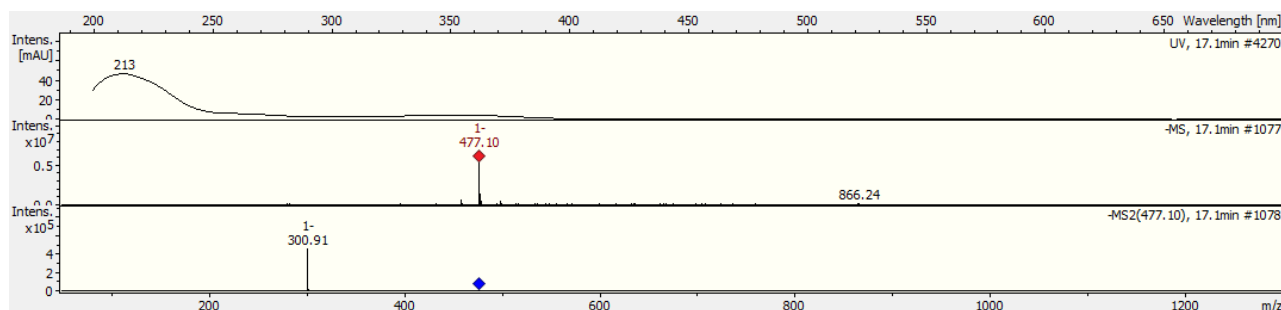


Figura 19 - Espectros de MS, MSMS e UV do flavonoide quercetina-3-O-glucuronido.

Fonte: Do autor.

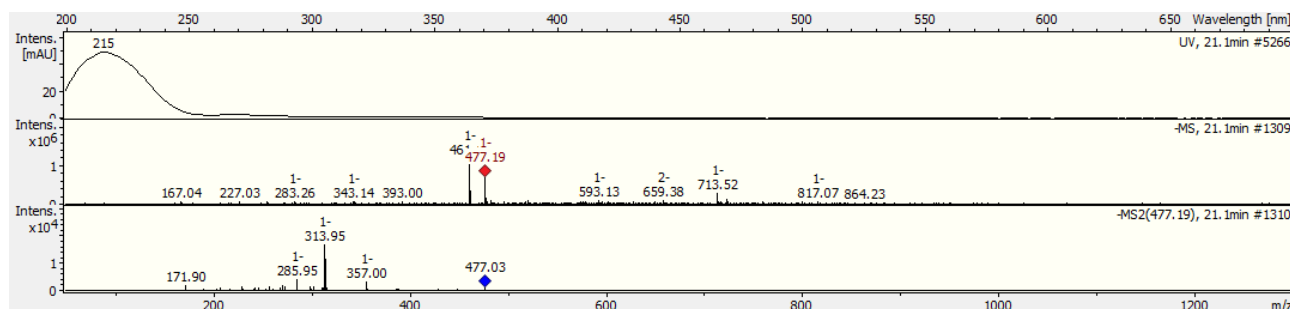


Figura 20 - Espectros de MS, MSMS e UV do flavonoide isoramnetin-3-O-glucósido.

Fonte: Do autor.

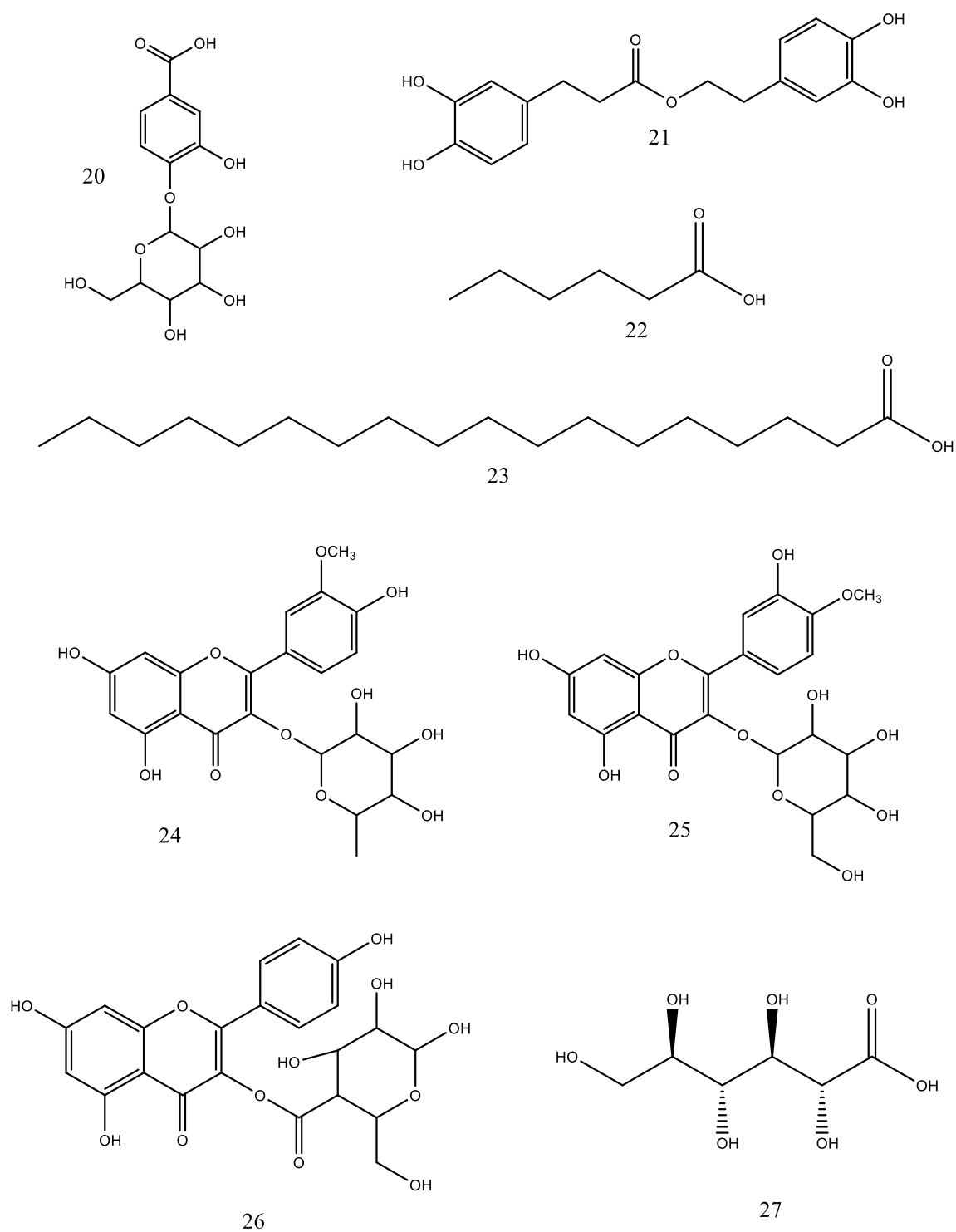


Figura 21 - Estrutura dos metabólitos identificados por CLAE-MSMS. Ácido protocatecuico-4-glucósido (**20**), ácido rosmárico (**21**), ácido caprílico (**22**), ácido octodecanóico (**23**), isoramnetina ramnose (**24**), diosmetin-6-C-hexose (**25**), caempfenol-3-O-acetil hexose (**26**), ácido glucônico (**27**).

Fonte: Do autor.

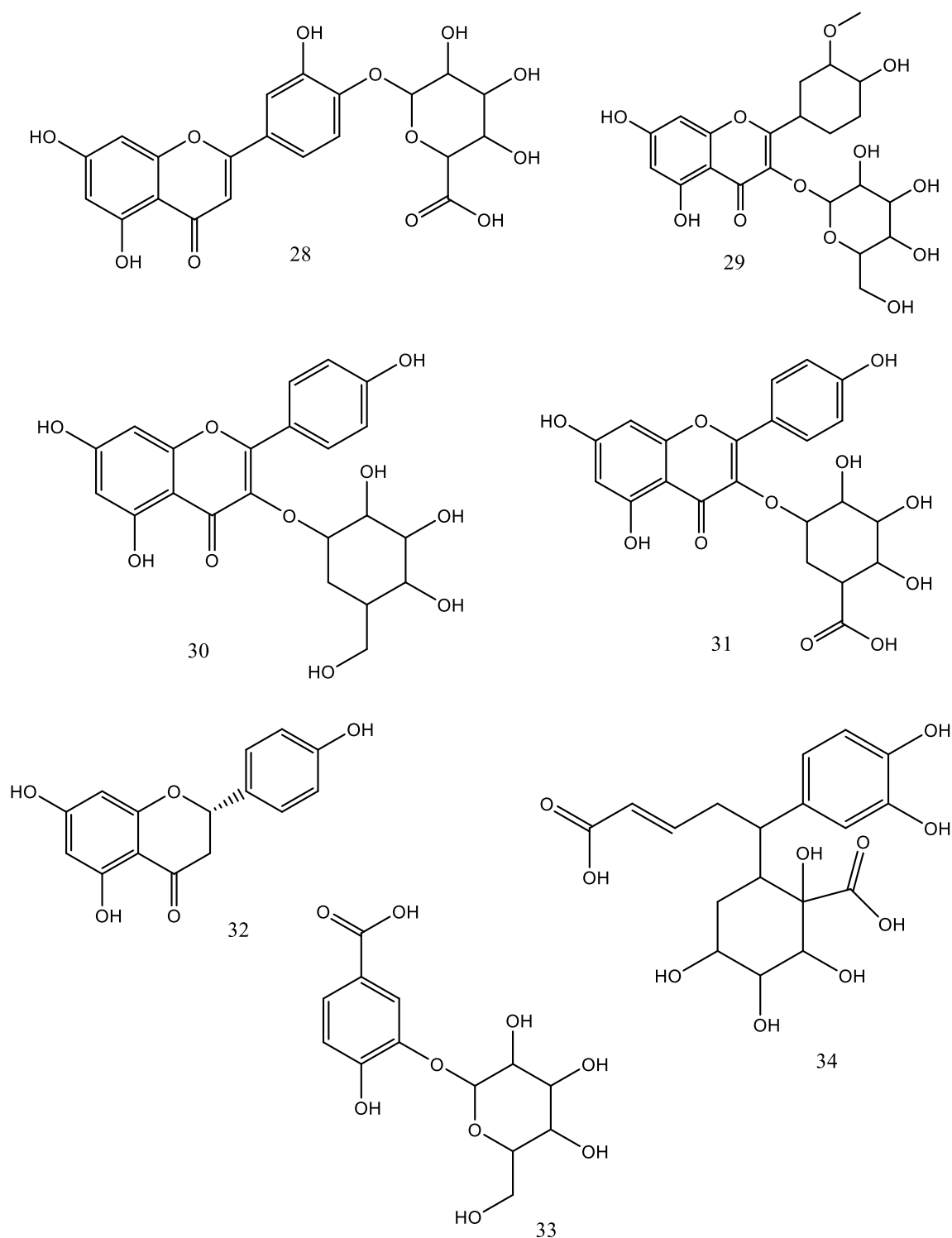


Figura 22 - Estrutura dos metabólitos identificados por CLAE-MSMS. Quercetina-3-O-glucuronido (**28**), isoramnetin-3-O-glucósido (**29**), caempfenol-3-O-hexose (**30**), caempfenol-3-O-glucuronido (**31**), naringenina (**32**), ácido protocatecuíco-O-hexose (**33**), ácido cafeoil-5-O-quinico (**34**).

Fonte: Do autor.

Em sua maioria, as moléculas identificadas são flavonoides, cujos tempos de retenção, espectro de UV e m/z foram comparados com padrões existentes na literatura.

Os flavonoides (Figura 23) são substâncias que pertencem a uma numerosa classe de polifenóis, bastante abundantes e estudados, que apresentam atividades antitumoral, antiviral, antioxidante e anti-inflamatória, dentre outras (HAVSTEEN, 2002; MIDDLETON, et al., 2000; VEITCH; GRAYER, 2008).

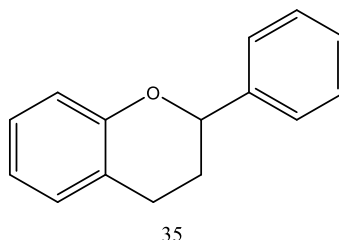


Figura 23 - Estrutura química geral de um flavonoide.

Fonte: Do autor.

Esta classe química é encontrada em diversas espécies do reino vegetal e apresentam um núcleo característico C6-C3-C6 (Figura 21). Além disso, possíveis modificações no anel central podem levar a divisão dessa classe em 8 subclasses distintas, tais como: chalconas (**36**), flavanonas (**37**), flavanonóis (**38**), flavonas (**39**), flavonóis (**40**), isoflavanos (**41**), flavan-3-ols (**42**) e antocianidinas (**43**, Figura 22) (BOOTS et al., 2008; COUTINHO, 2009).

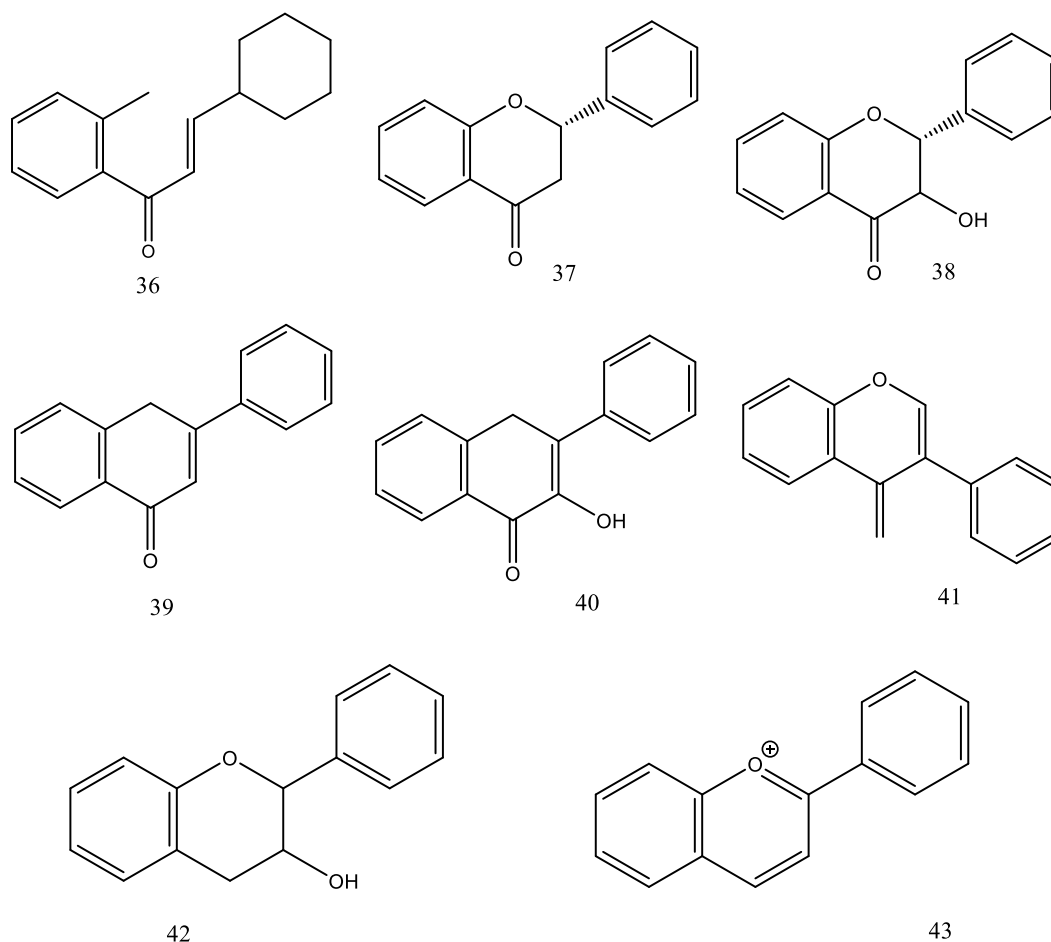


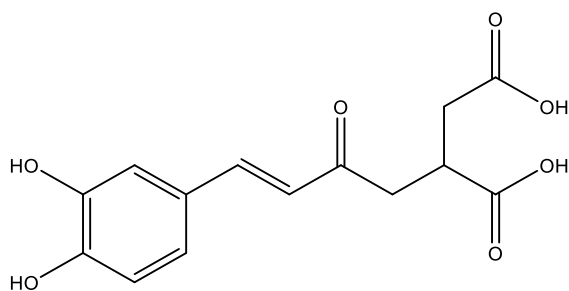
Figura 24 - Estrutura química das chalconas (**36**), flavanonas (**37**), flavanonóis (**38**), flavonas (**39**), flavonóis (**40**), isoflavonas (**41**), flavan-3-ols (**42**) e antocianidinas (**43**).

Fonte: Do autor.

Os flavonóis, como a quercetina (**7**, Figura 2) e o caempfenol (**8**, Figura 2) já foram descritos por sua significativa ação anti-inflamatória, atribuída a inibição das enzimas fosfolipase, lipoxigenase, cicloxigenase, além da inibição da produção de óxido nítrico (YOON e BAEK, 2005; SANTAGELO et al, 2007). Além destes, a flavona naringenina (**13**, Figura 8) também inibe a fosfolipase A₂ (COUTINHO, 2009).

Também merece destaque o pico com m/z 591, correspondente ao ácido cafeoilmálico (**19**, Figura 25), que é um composto fenólico, derivado éster do ácido cafeico, descrito por suas propriedades anti-inflamatória e analgésica. Seu mecanismo de ação anti-inflamatório está relacionado com sua capacidade de neutralizar espécies radiculares oxidativas geradas no decorrer do processo inflamatório. Esta substância foi identificada tanto no extrato bruto, como na fração acetato de etila, o que corrobora com os resultados farmacológicos obtidos, visto que o extrato bruto e suas frações apresentaram boa ação analgésica e anti-inflamatória. Até o

presente momento não foi possível o isolamento da substância utilizando as técnicas convencionais de purificação, como coluna cromatográfica.



19

Figura 25 - Estrutura do ácido cafeoilmálico.

Fonte: Do autor.

Em continuidade, a comparação dos espectros gerados com os padrões existentes na biblioteca da plataforma GNPS onde, a partir das redes formadas, foi possível identificar a localização dos metabólitos até então já identificados e com isso atribuir aos *clusters* (Figura 26) as respectivas classes químicas.

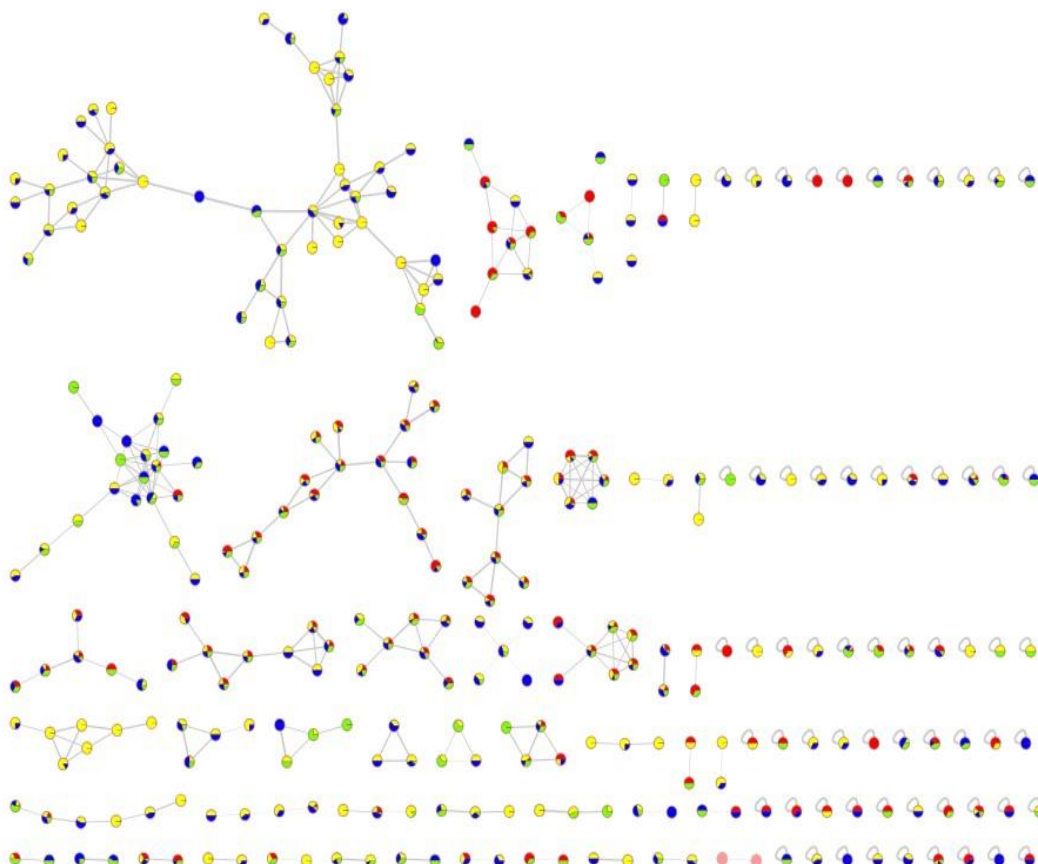


Figura 26 - Rede Molecular formada pelo software GNPS.

Fonte: Do autor.

Os clusters são formados pela similaridade de uma substância com e outra, por isso, espera-se que substâncias de mesma classe química estejam agrupadas. As linhas representam a diferença entre um metabólito e outro, ou seja, quando mais próximos estiverem, maior o grau de similaridade; do mesmo modo, quanto maior a sua distância, menor a similaridade estrutural. O programa foi alimentado com 4 diferentes dados de análise e cada análise foi representada por uma cor diferente. Na tabela 5 é mostrada a correlação de cada grupo com a respectiva cor.

Grupos	Amostra	Cor da representação
G1	Branco	Vermelho
G2	Fração Acetato de Etila	Amarelo
G3	Extrato Bruto	Azul
G4	Fração Hidroalcoólica	Verde

Tabela 5 - Grupos e suas cores resultantes da análise por GNPS.

Fonte: Do autor.

Nos clusters formados, cada círculo (*nodos*) representa um íon diferente, o que favorece a análise por comparação dos metabólitos já identificados. Descrevendo melhor: levando-se em consideração que a cor vermelha apresenta o espectro “branco”, utiliza-se esta informação para poder eliminar da análise possíveis interferentes e sujeira da coluna. Com isso, todos os círculos que apresentam a cor vermelha, são picos que estão presentes no “branco”, deste modo, todos estes picos são eliminados da análise. Clusters formados com mais de 50% de circunferências vermelhas, são também retirados da análise, pois como discutido anteriormente, não levamos em conta picos que existem no espectro “branco”.

A figura 27, mostra o cluster principal, onde acontece o maior agrupamento de substâncias, sendo que nesta rede foram identificados os flavonoides. As setas em vermelho mostram as substâncias que foram identificadas anteriormente, utilizando o método convencional de análise e localizadas nesta rede.

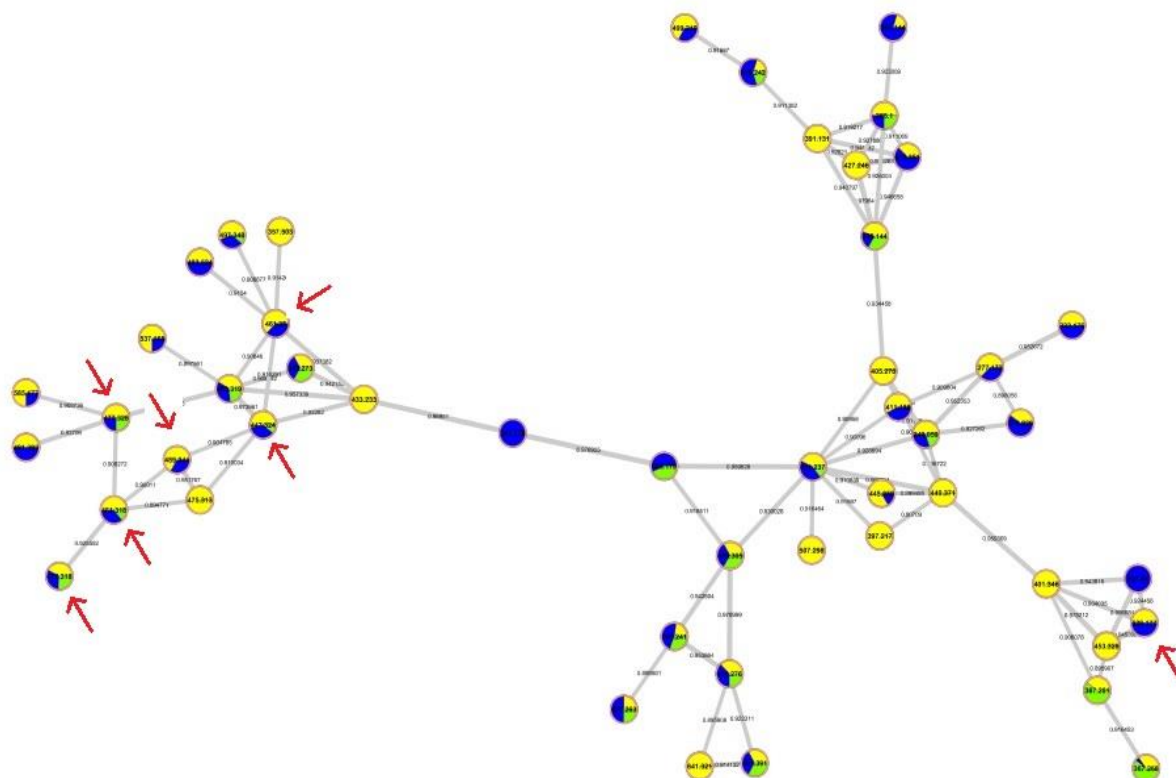


Figura 27 - Principal cluster da rede molecular retirado da Figura 22.

Fonte: Do autor.

Na desrepliação foram identificados flavonoides como a quercetina, caempferol e naringenina, Diante destes dados e considerando a elevada quantidade de outros flavonoides presentes no extrato de *Dillenia indica* L. podemos inferir que esta planta deva apresentar atividade anti-inflamatória, além da atividade analgésica observada no ensaio de hiperalgesia induzida por formalina, o que foi observada na segunda fase do teste de formalina.

Em suma, a análise combinada dos dados de perfil químico e dos resultados farmacológicos, é possível observar uma relação direta entre constituição química versus atividade biológica, confirmando as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto de frutos e suas frações.

Além disso, ficou evidente a participação dual dos sistemas canabinoide e opioide na atividade antinociceptiva, porém operando de forma diferenciada no extrato bruto e em suas frações. De fato, existe uma pesquisa contínua para descobrir-se novas alternativas medicamentosas para o tratamento da dor e da inflamação, buscando o desenvolvimento de medicamentos mais eficazes, melhor tolerados e mais econômicos (RAHMAN et al., 2015). Neste sentido, trabalhos como o nosso estão em sintonia com outros grupos de pesquisa ao redor do mundo. Um exemplo recente foi o trabalho de Rahman e colaboradores (2015) que

mostraram que não só o extrato, mas as diferentes frações das folhas de *Pandanus Foetidus* apresentavam efeito antinociceptivo em camundongos, também utilizando o modelo de nocicepção induzida por formalina. Em outro trabalho, Ghias e cols. estudaram o efeito antinociceptivo e a capacidade sequestrante de DPPH de 3 diferentes plantas paquistanesas, *Chenopodium botrys*, *Micromeria biflora* e *Teucrium stocksianum*, cujos extratos brutos mostraram ação antinoceptiva mais pronunciada, seguido pela fração metanólica. Estudos fitoquímicos evidenciaram a presença de flavonoides e taninos nos extratos e frações. No teste de avaliação antioxidante foi observada boa atividade, atribuída, também, à presença de flavonoides, levando os autores a concluírem que *Chenopodium botrys*, *Micromeria biflora* e *Teucrium stocksianum* apresentaram efeito antinociceptivo significativo em modelo animal, validando sua utilização tradicional para o tratamento da dor (GHIAS, 2016).

Devido ao fato de na Nigéria a população utilizar muitos produtos naturais por conta de seus efeitos analgésicos e anti-inflamatório, Ukwuaki e colaboradores estudaram o extrato das folhas de *Grewia crenata*, assim como suas frações hexano, clorofórmio, acetato de etila, butanol e aquosa. Para avaliar o efeito antinociceptivo foi realizado o teste de contorção abdominal induzido por ácido acético, revelando que todas as frações tiveram uma redução dose dependente significativa ($p < 0,05$) do efeito nociceptivo, o que foi corroborado no ensaio de placa quente. O estudo fotoquímico revelou a presença de glicosídeos, saponinas, taninos, flavonoides, bálsamo, antraquinonas e esteroides, o que levou os autores a concluírem que os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório deveriam ser decorrentes, sobretudo, da presença de flavonoides. De modo semelhante ao presente trabalho, Cruz e cols. estudaram a espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) para validar o seu uso popular no estado da Bahia, testando o extrato etanólico e frações das cascas da planta em modelos *in vivo* de inflamação e dor, que confirmaram sua utilização tradicional.

7 CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos a avaliação *in vivo* para atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, assim como no ensaio químico da atividade sequestrante de DPPH, foi possível confirmar que o extrato e frações da *Dillenia indica* L., de fato, apresentaram atividade analgésica e antioxidante, cujo efeito antinociceptivo é decorrente de ação sobre o sistema nervoso central, mediado pelos sistemas opioide e canabinoide. Além disso, os efeitos observados na segunda fase do teste de formalina sugeriram um possível efeito anti-inflamatório. Quanto ao estudo fitoquímico por desreplicação foram identificados uma série de metabólitos, como o ácido protocatecuíco-4-glucósido, ácido rosmárico, ácido caprílico, ácido octodecanóico, isoramnetina ramnose, diosmetin-6-C-hexose, caempfenol-3-O-acetil hexose, ácido glucônico, quercetina-3-O-glucuronido, isoramnetin-3-O-glucósido, caempfenol-3-O-hexose, caempfenol-3-O-glucuronido, naringenina, ácido protocatecuíco-O-hexose e ácido cafeoil-5-O-quínico, com vários outros constituintes ainda não identificados, especialmente na fração hidroalcoólica. A identificação do ácido cafeoilmálico na fração acetato de etila, já descrito na literatura por suas propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e no controle de espécies radicalares, sugerem sua possível participação, pelo menos em parte, no efeito farmacológico observado, podendo ser um dos principais ativos. O estudo de desreplicação, bem como a validação dos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios dos frutos de *D. indica* está sendo reportado pela primeira vez, devendo contribuir decisivamente para o melhor conhecimento químico desta planta, assim como de seu potencial medicinal, uma vez que seu uso tradicional como analgésico e anti-inflamatório está validado e poderá representar uma nova alternativa de desenvolvimento de medicamento fitoterápico, com efeito analgésico decorrente da interação com receptores opioides e canabinoides, sem efeitos sedativos e locomotores, sem toxicidade aguda significativa.

REFERÊNCIAS

- ABDILLE, M. H., et al. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, v. 90, n. 4, p.891–896, 2005.
- ABRAM, S.E., Olson, E.E., Systemic opioids do not suppress spinal sensitization administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal of Pharmacology** v. 137, n. 2, p. 170–176, 2002.
- AKTER, R., et al. Cytotoxic activity screening of Bangladeshi medicinal plant extracts. **Journal of Natural Medicines**, v. 68 n. 1, p.246–252, 2014.
- ALAM, B., HOSSAIN S., HAQUE, E. Evaluation of antimicrobial and toxicity of different fractions of *Dillenia indica* Linn. bark extract. **Journal of Global Pharma Technology**. v. 11, n. 2, p.37-42, 2010.
- AMRITVEER, B.,et al. A review update on *Dillenia indica* f. *elongata* (Miq.). **Journal of Drug Delivery & Therapeutics**. v. 6, n. 2, p.62–70, 2016.
- APU, A., et al. Antimicrobial Activity and Brine Shrimp Lethality Bioassay of the Leaves Extract of *Dillenia indica* Linn. **Journal of Young Pharmacists**, v. 2 n. 1, p.50–53, 2010.
- BARNES, E.C.; ROHITESH, K.; DAVIS, R.A. The use of isolated natural products as scaffolds for the generation of chemically diverse screening libraries for drug Discovery. **Natural Product Reports**, v. 33, p. 372-381, 2016.
- BARRIERE DA, MALLET C, BLOMGREN A et al. Fatty acid amide hydrolase- dependent generation of antinociceptive drug metabolites acting on TRPV1 in the brain. **PLoS ONE**. v. 8, n. 8, p. e70690, 2013.
- BISWAS, S., et al. Phytochemical analysis and chromatographic evaluation of alcoholic extract of *Dillenia indica* Linn. leaves. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 2, p.2799–2812, 2015.
- BOGLIOLO, L.; FILHO, B., **Patologia Geral**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013.
- CICHEWICZ DL. Synergistic interactions between cannabinoid and opioid analgesics. **Life Sciences**. v. 4, n. 11, p.1317-1324, 2004.
- COUTO, V. M, et al., Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p.348-353, 2011
- COMPTON DR, JOHNSON MR, MELVIN LS, MARTIN BR. Pharmacological profile of a series of bicyclic cannabinoid analogs: Classification as cannabimimetic agents. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**. v. 260, n.1, p.201–209, 1992.

COUTINHO, MARCELA A. S.; MUZITANO, MICHELE F.; COSTA, S. S. Flavanoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p.241–256, 2009.

DA FONSECA PACHECO D, FREITAS AC, PIMENTA AM, DUARTE ID, DE LIMA ME. A spider derived peptide, PnPP-19, induces central antinociception mediated by opioid and cannabinoid systems. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**. p.22-34, 2016.

DA FONSECA PD, KLEIN A, DE CASTRO PA, DA FONSECA PACHECO CM, DE FRANCISCHI JN, DUARTE ID. The mu-opioid receptor agonist morphine, but not agonists at delta-or kappa-opioid receptors, induces peripheral antinociception mediated by cannabinoid receptors. **British Journal Pharmacology**, v. 154, n. 5, p.1143–1149, 2008.

DEVANE WA, HANUS L, BREUER A, PERTWEE RG, STEVENSON LA, GRIFFIN G, GIBSON D, MANDELBAUM A, ETINGER A, MECHOULAM R. Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. **Science**, v. 258, n. 5090, p.1946-1949, 1992.

DEVANE WA, DYSARZ FA, JOHNSON MR, MELVIN LS, HOWLETT AC. Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. **Molecular Pharmacology**, v. 34, n. 5, p.605–613, 1988.

DHAWAN BN, CESSSELIN F, RAGHUBIR R, et al. International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. **Pharmacology Reviews**, v. 48, n. 4, p.567-592, 1996.

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 – SP, **Dor On Line**; 2011.

FOWLER, C.J.; et al. Pharmacological properties of cannabinoid receptor in the avian brain: similarity of rat and chicken cannabinoid1 receptor recognition sites and expression of cannabinoid2 receptor-like immunoreactivity in the embryonic chick brain. **Pharmacology Toxicology**, v. 88, n. 4, p.213-222, 2001.

FRAGATA, F.S; IMAGAWA, V.I. **Analgesia na Terapia Intensiva**. In: SANTOS, M.M.; FRAGATA, F.S. *Emergência e Terapia Intensiva Veterinária em Pequenos Animais: Bases para o atendimento hospitalar*. 2.ed. São Paulo: Roca, 2008. Cap.41, p. 817 – 836.

FU C, et al. Structure and Antioxidant Activities of Proanthocyanidins from Elephant Apple (*Dillenia indica* Linn.). **Journal of Food Sciences**, v. 80, n.10, p.2191-2199, 2015.

GANDHI, D., MEHTA, P., *Dillenia indica* Linn. and *Dillenia pentagyna* Roxb.: pharmacognostic, phytochemical and therapeutic aspects. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3 n. 11, p.134–142, 2013.

GHAFFARI M., et al. Biological Activity of Betulinic Acid: A Review. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 3, n. 2, p.119–123, 2012

GHOSH, P. S., et al. Lupane-triterpenoids from stem bark of *Dillenia indica*. **Indian Journal of Chemistry - Section B Organic and Medicinal Chemistry**, v. 53, n. 10, p.1284–1287, 2014.

GUINDON, J. A novel inhibitor of endocannabinoid catabolic enzymes sheds light on behind the scene interplay between chronic pain, analgesic tolerance, and heroin dependence. **Neuropharmacology**, v. 114, p. 168-171, 2017.

HARVEY, A.L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19, p.894-901, 2011.

HOLT S, PAYLOR B, BOLDRUP L ET AL. Inhibition of fatty acid amide hydrolase, a key endocannabinoid metabolizing enzyme, by analogues of ibuprofen and indomethacin. **European Journal of Pharmacology**, v. 565, n.1-3, p.26–36, 2007.

INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/index.aspx>> Acessado em: 18 July 2017.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Básica e Clínica**. Ed. 12, AMGH editora Ltda, 2014.

KUMAR D., et al. Anti-leukemic activity of *Dillenia indica* L. fruit extract and quantification of betulinic acid by HPLC. **Phytomedicine**, v. 17, n. 6, p.431–435, 2010.

KUMAR, S., et al. Antidiabetic and antihyperlipidemic effects of *Dillenia indica* (L.) leaves extract. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, n. 2, p.373–378, 2011.

KUMAR, S., et al. Microscopic evaluation and physiochemical analysis of *Dillenia indica* leaf. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 5, p. 337–340, 2010.

LAHKAR, S., et al. An overview on application of *Dillenia indica*, *Abelmoschus esculentus*, *Oryza sativa* and *Plantago ovata* as pharmaceutical excipients. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 28, n. 2, p. 23–27, 2014.

LIMA, C. C.; LEMOS R. P.; CONSERVA, L. M., Dilleniaceae family: an overview of its ethnomedicinal uses, biological and phytochemical profile. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 3, n. 2, p.181-205, 2014.

MALLET C, DAULHAC L, BONNEFONT J ET AL. Endocannabinoid and serotonergic systems are needed for acetaminophen-induced analgesia. **Pain**, v. 139, n. 1, p.190–200, 2008.

MANNING, B.H. A lateralized deficit in morphine antinociception after unilateral inactivation of the central amygdala. **The Journal of Neuroscience**, v. 18, n. 22, p.9453–9470, 1998.

MARQUEZ, J. O. **Dor**, diagnóstico e tratamento: Bases de anatomia e fisiopatologia. v. 1, n. 1, 2004.

MATHEWS, K.A. Pain assessment and general approach to management. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p.729-755, 2000.

MCKERROW, J.H. Recognition of the role of Natural Products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015. Nobel prize in physiology or medicine. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p.1610–1611, 2015.

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

MILLER, L.H.; SU, X. *Artemisinin*: Discovery from the Chinese Herbal Garden. **Cell**, v. 146, n. 6, p.855-858, 2011.

MUIR III, W.W. **Fisiologia e fisiopatologia da dor**. In: GAYNOR, J.S.; MUIR III, W.W. Manual de controle da dor em medicina veterinária. 2ªed. São Paulo: Medvet, 2009. Cap.2, p. 13 – 41.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v. 66. n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, v. 75, n. 3, p.311–335, 2012.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p.629-661, 2016.

OTTANI A, LEONE S, SANDRINI M, FERRARI A, BERTOLINI A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 531, n. 1-3, p.280–281, 2006.

PACHECO DF, KLEIN A, PEREZ AC, PACHECO CM, FRANCISCHI JN, REIS GM, et al. Central antinociception induced by μ -opioid receptor agonist morphine, but not delta- or kappa-, is mediated by cannabinoid CB1 receptor. **British Journal of Pharmacology**, v.158, n. 1, p.225–31, 2009.

PARVIN, M. N., et al. Chemical and biological investigations of *Dillenia indica* Linn. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 4, n. 2, p.122–125, 2009.

RAHMAN MM, UDDIN ME, ISLAM AM, CHOWDHURY MA, RAHMAN MA. CNS Depressant and Antinociceptive Effects of Different Fractions of *Pandanus foetidus* Roxb. Leaf Extract in Mice. **The Malaysian Journal of Medicinal Sciences**. v. 22, n. 3, p.33-40, 2015.

ROBBINS, COTRAN: **Bases Patológicas das Doenças**. 8ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

ROSLAND, J.H., et al. The formalin test in mice. Effect of the formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p.235–242, 1990.

SINGH, G., et al. Evaluation of Phenolic Content Variability along with Antioxidant, Antimicrobial, and Cytotoxic Potential of Selected Traditional Medicinal Plants from India. **Frontiers in Plant Science**, v.7, n.407, p.1-12, 2016

SINGH, P. A., et al. Evaluation of in vivo anti-inflammatory and analgesic activity of *Dillenia indica* f. *elongata* (Miq.) Miq. and *Shorea robusta* stem bark extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 1, p.75–81, 2016.

TJØLSEN, A., BERGE, O.G., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J.H., HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p.5–17, 1992.

TRANQUILI, W.J.; GRIMM, K.A.; LAMONT, L.A. **Tratamento da dor para o clínico de pequenos animais**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2005.

VERDAM, M. C. D. S., et al. Analgesic, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Activities of *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae). **Scientific World Journal**, v. 2017, n. 8367042, 2017.

Welch SP, Eads M. Synergistic interactions of endogenous opioids and cannabinoid systems. *Brain Res*, v. 848, n. 1–2, p.183–90, 1999.

YAMAMOTO, T., NOZAKI-TAGUCHI, N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. **Anesthesia and Analgesia**, v. 94, p.962–967, 2002.

YAMAMOTO, T., NOZAKI-TAGUCHI, N., CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal of Pharmacology** 137, p. 170–176, 2002.

YESHWANTE, S. B., et al. Anti-inflammatory activity of methanolic extracts of *Dillenia indica* L. leaves. **Journal of Young Pharmacists**, v. 1, n. 1, p. 63–65, 2009.

ZEB A, AHMAD S, ULLAH F, AYAZ M, SADIQ A. Anti-nociceptive Activity of Ethnomedicinally Important Analgesic Plant *Isodon rugosus* Wall. ex Benth: Mechanistic Study and Identifications of Bioactive Compounds. *Front Pharmacol*. 2016 Jul 6; 7:200.