

## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Spondia tuberosa* (ANACARDIACEA) EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Raiff dos Santos Dantas (1); Hilton César P. de Albuquerque (2); Ingrid Laiz de O. Cabral (3); Lucas Linhares De Lócio (4); Vanda Lucia dos Santos (5)

*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – e-mail: raiff.sd@hotmail.com (1)*

*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – e-mail: hiltoncesar00@hotmail.com (1)*

*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – e-mail: ingridocabral@hotmail.com (2)*

*Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) – e-mail: lucas\_linhares10@hotmail.com (3)*

*Universidade Estadual da Paraíba UEPB – e-mail: vandals@ccbs.uepb.edu.br (4)*

**Resumo:** A família Anacardiaceae é composta por mais de 70 gêneros e mais de 600 espécies. O gênero *Spondias* é constituído de dez a quinze espécies, e algumas destas tem atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e antiulcerogênica comprovadas, a partir de testes em animais experimentais. *Spondia tuberosa* Arruda, conhecida popularmente como umbu, é encontrado na região Nordeste do semiárido brasileiro e é endêmica da caatinga. Possui alto poder antioxidante, que reduz os danos causados pelas espécies reativas, tais como envelhecimento prematuro e aparecimento de doenças degenerativas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *S. tuberosa* (EEtOH-St) nas doses 125 mg/kg, 250 mg/kg e 500 mg/kg. Foram utilizados ratos albinos Wistar. Na determinação da atividade antinociceptiva foi utilizado o método da formalina. E o modelo para a avaliação da atividade anti-inflamatória foi peritonite induzida por carragenina. Observou-se na atividade antinociceptiva que a dose 125mg/kg não influenciou na resposta da primeira fase de nocicepção e que a dose 250 mg/kg do EEtOH-St na segunda fase teve uma inibição maior (100%). Na avaliação da atividade anti-inflamatória dentre as doses do extrato testadas, apenas a 500 mg/kg foi capaz de inibir a migração celular. Diante destes resultados, é importante que outros modelos experimentais sejam testados, para que possa evidenciar a atividade desta planta como antinociceptiva e anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** *Spondia tuberosa*, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória, formalina, carragenina.

### **INTRODUÇÃO**

O organismo quando expostos a estímulos nocivos produz uma sensação desagradável que é recebida pelo indivíduo e manifestada na forma de dor fisiológica ou patológica. O componente fisiológico da dor é chamado nocicepção, que consiste nos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em

resposta a um estímulo nocivo externo. No processo patológico o estímulo é persistente e pode estar associado com inflamação e lesão tecidual (KLAUMANN *et al.*, 2008).

Analgesia é o termo utilizado para o alívio ou o término de sensação dolorosa. As substâncias que tem a capacidade de produzir analgesia são designadas analgésicos (BENEDITO, 2009)

Atualmente as terapias convencionais para o tratamento da dor, em geral,

baseiam-se em três principais classes de drogas: anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs), analgésicos opióides e um grupo de drogas com ações farmacológicas diversas, conhecidas como adjuvantes, compreendendo antidepressivos, anticonvulsivantes, anestésicos locais, agonistas dos receptores 2-adrenérgicos e agonistas gabaérgicos, entre outros. (CARLINI E MENDES, 2011).

A inflamação é uma reação do organismo frente a uma infecção ou lesão de tecidos. O processo inflamatório é deflagrado pela vasodilatação, seguida de hiperemia, provocados por mediadores químicos, como histamina, bradicinina e prostaglandinas, sendo os dois últimos importantes na iniciação e manutenção da dor (XU 27 *et al.*, 2014).

Anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) ou esteróides (AIEs) são utilizados para tratar diferentes doenças inflamatórias (MEHTA *et al.*, 2013). Os AINEs inibem uma das isoformas da Cicloxigenase (COX-1 ou COX-2), bloqueando a produção de agentes inflamatórios, notadamente, as prostaglandinas. Apesar de seus efeitos benéficos, aos AINEs estão associados alguns efeitos adversos como asma, rinite, reações cutâneas, anafilaxia, hipersensibilidade e lesões gástricas, deste

modo, agentes que produzam poucos efeitos adversos são cada dia mais desejáveis para substituir a terapêutica química (VARALDA E MOTTA, 2009).

Muitos fármacos atuais são derivados direta ou indiretamente de substâncias produzidas por plantas superiores (SILVA, 2010). No Brasil há uma grande diversidade vegetal, as plantas tem sido de grande importância na área farmacêutica, pois é a partir destas que são descobertas substâncias ativas isoladas capazes de desenvolver novos fármacos (SANTOS *et al.*, 2009).

A família Anacardiaceae é composta por mais de 70 gêneros e mais de 600 espécies. Do ponto de vista fitoquímico, são ricos em metabólitos secundários, em compostos fenólicos, com atividades biológicas, como: antioxidante, antiulcerogênica e anti-inflamatória (ENGELS *et al.*, 2012).

O gênero *Spondias* é constituído de dez a quinze espécies, com destaque para o umbuzeiro (*S. tuberosa* Arruda), a cajazeira (*S. mombim* L.) e a cerigueleira (*S. purpurea* L.).

*Spondia tuberosa* Arruda uma espécie limitada da Mata Atlântica, do Cerrado e da região pré-amazônica, também é encontrada nas caatingas elevadas da Serra da Borborema (LIMA FILHO 2011). Os frutos dessa planta são fontes de vitaminas (B1, B2, A, C e niacina) e minerais (cálcio,

fósforo e ferro) (VIDIGAL *et al.*, 2011). Segundo Vidigal *et al.* (2011) as folhas das *Spondias tuberosas* tem um alto teor de tanino e polifenóis.

Diante do que foi exposto, e sabendo do potencial farmacológico do gênero e desta espécie, o objetivo do trabalho foi avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Spondia tuberosa* Arruda (Anacardiaceae) em modelos experimentais.

## METODOLOGIA

### Material vegetal

O material botânico utilizado para os experimentos foram folhas obtidas da espécie *Spondias tuberosa* Arruda, coletado na Fundação Universitária de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Extensão (FURNE), localizada em Campina Grande-Paraíba. Uma excisada desta espécie encontra-se depositada no Herbário Arruda Câmara da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob registro ACAM 00176.

### Preparação do extrato

As folhas foram secas em estufa com circulação de ar a 40°C (Fanem® 330) e

pulverizadas em moinho de facas. O pó obtido foi submetido à percolação com etanol e a extração foi realizada por esgotamento. Obtendo-se a solução extrativa, esta foi concentrada no evaporador rotativo (Quimis® Q334B) para obter o Extrato Etanólico Bruto (EEtOH).

### Animais

Os animais utilizados nos ensaios foram ratos machos e fêmeas albinos, linhagem Wistar pesando entre 180- 200g; todos provenientes do laboratório de ensaios farmacológicos da UEPB. Os animais foram mantidos sob temperatura  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e ciclos claro-escuro controlado de 12 horas. Os experimentos foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/CESED – PB sob registro n° 0045/22052014.

### Atividade antinociceptiva - teste de formalina

Os ratos foram submetidos a um jejum de 8 horas, em seguida foram pré-tratados oralmente com indometacina 10mg/kg (controle positivo), veículo 10 ml/kg (controle negativo) e o EEtOH- St nas doses 125, 250 e 500mg/kg, para cada grupo foram utilizados 06 animais. Após 60 minutos foi administrado 50µl de

formalina 1% na pata do animal. Logo em seguida, estes animais foram colocados individualmente, sob um funil de vidro para observação do comportamento do animal (HUNSKAAR *et al.*, 1985, com adaptações). O tempo que o animal permaneceu mordendo, lambendo ou sacudindo a pata injetada com formalina foi cronometrado. Os primeiros 5 minutos (300 segundos) após a injeção de formalina foi cronometrado e reiniciou a contagem após 10 minutos por 15 minutos consecutivos.

#### **Atividade anti-inflamatória – peritonite induzida por carragenina**

Os ratos foram submetidos a um jejum de 12 horas, em seguida foram pré-tratados oralmente com dexametasona 5mg/kg (AIE) (controle positivo), veículo 10 ml/kg (controle negativo) e o EEtOH-St em diferentes concentrações (125, 250 e 500mg/kg), para cada grupo foram utilizados 06 animais. Após 60 minutos foi administrado 500µl (500µg/cavidade) de carragenina na cavidade peritoneal. Os animais foram anestesiados 3 horas após a injeção de carragenina e 10 ml de solução de EDTA (1mg/ml) foi injetada na cavidade peritoneal e uma massagem suave foi realizada para uma subsequente coleta

do fluido do peritônio. Este foi centrifugado (1.000 rpm, 5 minutos) à temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuspenso em 1 ml de salina (BASTOS *et al.*, 2007, com adaptações). Logo após, 10µL da suspensão foi diluída em 190µL de solução de Turk e os leucócitos totais foram contados em câmara de Neubauer, sob microscópio óptico.

#### **Análise estatística**

Os resultados foram tratados utilizando-se a análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós-teste Dunnett e/ou Tukey. Todos os resultados foram expressos como média±desvio padrão (d.p.) da média e o nível de significância mínimo foi de  $p < 0,05$ . Os resultados foram analisados com o software, *Graph Pad Prism 5.0*, San Diego, CA, EUA.

### **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### **Teste de formalina**

A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos

com diferentes mecanismos de ação (SILVA, *et al.* 2013; RANDOLPH, 1997).

O formaldeído diluído (1-8%), quando administrado por via subcutânea, produz um comportamento nociceptivo que consiste em uma resposta bifásica. (BRITO, 2013)

Segundo Garcia *et al.* (2012) a resposta correspondente a “Fase I” é de origem neurogênica, atribuída à ativação direta de nociceptores e é caracterizada por ocorrer em um curto período (de 0-15 minutos), já a “Fase II”, é de origem inflamatória, e está associada à liberação de mediadores endógenos locais que geram respostas inflamatórias responsáveis pela ativação e sensibilização de aferentes primários, e ocorre em um período mais longo (15-60 minutos).

Quando avaliado o efeito antinociceptivo, verificou-se que o EEtOH-St 125mg/kg, não influenciou na resposta da primeira fase de nocicepção, e a indometacina 10mg/kg teve pouca influência, quando comparado com o grupo controle negativo. Para a fase II, observou-se que a dose 250 mg/kg do EEtOH-St teve uma inibição maior do que o próprio anti-inflamatório utilizado (Tabela 01 e Figura 1). Ainda, o EEtOH-St reduziu o tempo que o animal permaneceu lambendo ou sacudindo a pata na fase

neurogênica, porém foi mais evidenciado na fase inflamatória.

Segundo Baggio (2010) uma possível explicação para o ocorrido seria que o extrato em estudo atuou na sensibilização de nociceptores. Ainda com relação aos resultados desta pesquisa, os mesmos estão de acordo com estudo realizado por Castro (2011) quando relata que a eficácia da indometacina, anti-inflamatório não-esteroidal, só é mais visualizada na segunda fase (nocicepção inflamatória).

Os resultados obtidos com EEtOH-St divergem dos encontrados por Silva (2012), onde observou em estudo utilizando extrato e fases das folhas de *Spondias* sp. uma inibição apenas da segunda fase, evidenciando a ação apenas anti-inflamatória.

### **Peritonite induzida por carragenina**

Em 1962, Winter *et al.*, após testarem uma variedade de materiais capazes de induzir inflamação, concluíram que o agente flogístico de escolha para testar antiinflamatórios era a Carragenina, um mucopolissacarídeo derivado de algas marinhas denominadas *Chondrus*. Segundo Ceranto *et al.* (2005), diferente de outros agente pró-inflamatórios, como o óleo de mostarda, a carragenina causa uma inflamação do tipo não-neurogênica, não é antigênica, não produz efeitos sistêmicos e



proporciona um alto grau de reprodutividade (CERANTO, *et al.* 2005) Seu mecanismo de ação consiste em induzir a migração leucocitária podendo ser por sinergismo entre prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>), leucotrienos LTB<sub>4</sub> e outros potentes agentes quimiotáticos, como complemento (C5a) e interleucinas (IL-8), promovendo vasodilatação, exsudação plasmática e acúmulo de leucócitos no local da lesão (BORGES, 2010).

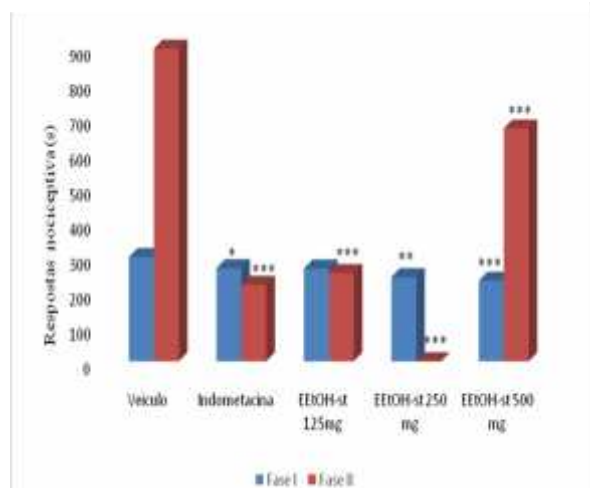
Desta forma, ao utilizar a carragenina como agente indutor, foi possível produzir uma resposta inflamatória no interior da cavidade peritoneal de ratos 3 horas mais tarde, com um grande número de células de defesa no exsudato peritoneal como observado no grupo controle (veículo). Por outro lado, a administração oral do EEtOH-St somente na dose 500 mg/kg inibiu a migração celular, seguindo um perfil semelhante ao da dexametasona (Tabela 02 e Figura 2).

Os resultados da pesquisa estão de acordo com os observados por Borges (2010) quando relata em seu estudo que o aumento numérico de leucócitos (neutrófilos) corresponde a uma resposta ao estímulo promovido pela administração da carragenina.

Em estudo realizado por Silva (2012) com gênero *Spondias*, utilizando a dose

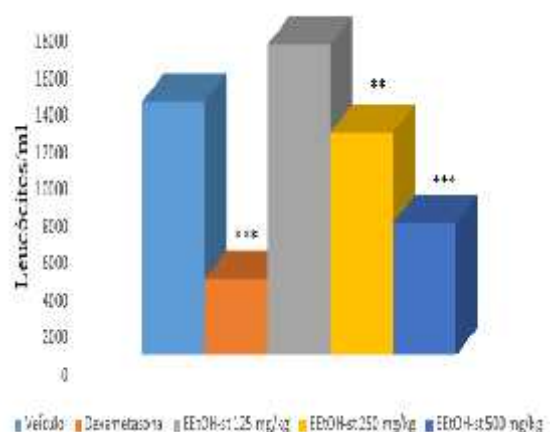
300 mg/kg, encontrou-se resultados significantes no que diz respeito a atividade anti-inflamatória na cavidade peritoneal.

**Figura 1-** Efeito da adm. oral do EEtOH-St e da indometacina sobre a resposta nociceptiva, em segundos



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, \* =  $p < 0,05$ ; \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

**Figura 2-** Efeito do EEtOH-St na atividade anti-inflamatória em ratos avaliados no modelo de peritonite induzida por carragenina.



Os resultados estão expressos como média  $\pm$  d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, \*\* =  $p < 0,01$ ; \*\*\* =  $p < 0,001$ .

**Tabela 1.** Efeito antinociceptivo avaliado pelo teste de nocicepção induzida pela formalina

Tratamentos	Dose via oral	Fase I (s)	% de inibição	Fase II (s)	% de inibição
Veículo	10 ml/kg	300±0	-	900±0	-
Indometacina	10 mg/kg	268±22*	10,66	220±24***	75,55
EEtOH-St	125 mg/kg	267±33	11,00	254±26***	71,77
EEtOH-St	250 mg/kg	242±46**	19,33	0***	100,00
EEtOH-St	500 mg/kg	232±35***	22,66	670±12***	25,55

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, \* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001.

**Tabela 2.** Efeito da folha do EEtOH-St na atividade anti-inflamatória em ratos avaliados no modelo de peritonite induzida por carragenina

Tratamentos	Dose via oral	Leucócitos/ml	% de inibição
Veículo	10 ml/kg	13667±781	-
Indometacina	5 mg/kg	4130±509***	69,78%
EEtOH-St	125 mg/kg	16720±1457**	22,33%
EEtOH-St	250 mg/kg	11970±1583	-
EEtOH-St	500 mg/kg	7120±1533***	47,90%

Os resultados estão expressos como média ± d.p. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do teste de Dunnett comparado ao grupo veículo, \* = p<0,05; \*\* = p<0,01; \*\*\* = p<0,001.

## CONCLUSÃO

O extrato das folhas das *Spondia tuberosa* Arruda diante da realização dos modelos antinociceptivo e anti-inflamatório, apresentaram bons resultados, corroborando com estudos de outros autores com plantas do mesmo gênero; porém se faz necessário testar estas atividades em outros modelos experimentais, para que possa desta forma

confirmar a participação desta planta nas atividades mencionados.

## REFERÊNCIAS

BAGGIO, C.H. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1 3),(1 6) - glucana isolada do *Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.** Curitiba. Originalmente apresentada como

dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2010.

BASTOS, L.F.S. et al. Characterization of the antinociceptive and anti-inflammatory activities of doxycycline and minocycline in different experimental models. **Eur. J. Pharmacol.**, Belo Horizonte, v.576, p. 171–179, 2007.

BENEDITO, R.B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (s) -(-)-álcool perílico em camundongos.** João Pessoa. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade Federal da Paraíba, 2009.

BOLETA-CERANTO, Daniela de Cassia Faglioni; VEIGA, Maria Cecília Ferraz de Arruda; ARSATI, Franco. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Rev. odontol. ciênc.**, v. 20, n. 50, p. 354-360, 2005.

BORGES, J.C.M. **Acetilbergenina: obtenção e avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.** Belém. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade Federal do Pará, 2010.

BRITO, R.G. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do citronelol em roedores.** Aracaju. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade Federal de Sergipe, 2013.

CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. **Protocolos em psicofarmacologia comportamental: Um guia para pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais.** São Paulo: Editora Fap-Unifesp, 2011.

ENGELS, C. et al. Characterization of phenolic compounds in jocote (*Spondias purpurea* L.) peels by ultra high-performance liquid chromatography/electrospray ionization mass spectrometry. **Food Res Int.**, v. 46, p. 557–562, 2012.

GARCIA, Tayllon et al. Influência dos Receptores 5-HT<sub>3</sub> no Processamento Nociceptivo de Ratos Submetidos ao Teste da Formalina. **Rev. Neurociênc.**, 20(4):527-533, 2012.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia. **J. Neurosci. Meth.**, v.14, p. 69-76, 1985.



KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. PATOFISIOLOGIA DA DOR. **Arch. Vet. Sci.**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

LIMA-FILHO, J.M.P. **Ecofisiologia do Umbuzeiro (*Spondias tuberosa* Arr. Cam.)**. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011.

MEHTA, J.P. et al. In-vitro antioxidant and in-vivo anti-inflammatory activities of aerial parts of Cassia species. **Arab J Chem.**, 2013.

RANDOLPH, Bryan C.; PETERS, Marvin A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **Anesthesia progress**, v. 44, n. 1, p. 11, 1997.

SANTOS, E.B. et al. Estudo etnobotânico de plantas medicinais para problemas bucais no município de João Pessoa, Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 19, p. 321-324, 2009.

SILVA, G.A. **Avaliação da composição química, atividade antioxidante, antibacteriana, antinoceptiva, antiinflamatória e toxicidade do extrato metanólico e frações de folhas de *Spondias* sp. (Anacardiaceae)**. Rio Grande do Norte. Originalmente

apresentada como dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte, 2012.

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

SILVA, L.M. **Mecanismos de ação envolvidos no efeito gastroprotetor do extrato etanólico de *Arctium lappa* L. em úlceras gástricas crônicas induzidas por ácido acético em ratos**. Curitiba. Originalmente apresentada como dissertação de mestrado. Universidade Federal do Paraná, 2010

VARALDA, D.B.; MOTTA, A.A. Reações adversas aos antiinflamatórios não esteroidais. **Rev. Bras. Alerg. Imunopatol.**, v. 32, n.1, p.27-34, 2009.

VIDIGAL, M.C.T.R. et al. Effect of a health claim on consumer acceptance of exotic Brazilian fruit juices: Açai (*Euterpe oleracea* Mart.), Camu-camu (*Myrciaria dubia*), Cajá (*Spondias lutea* L.) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda). **Food Res Int.**, 44, p. 1988–1996, 2011.

Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antinflammatory Drugs. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med.** 1962; 111:544-7.

XU, Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of Flos populi. **J Ethnopharmacol.**, v. 152, p. 540–545, 2014.