



Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto
Mestrado Acadêmico



ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO
ANTINOCICEPTIVO DA *Persea americana* Mill.

TÁZIA LOPES DE CASTRO

São Luís

2020

TÁZIA LOPES DE CASTRO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO
ANTINOCICEPTIVO DA *Persea americana* Mill.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

Área de Concentração: Saúde e Metabolismo Humano

Linha de Pesquisa: Alterações Endócrinas

Orientador: Prof.^a Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Co-orientador: Prof. Dr. João Batista dos Santos Garcia

Coordenador: Maria do Desterro Soares Brandão Nascimento

São Luís

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Castro, Tázia Lopes de.

Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo da Persea americana Mill / Tázia Lopes de Castro. - 2020.

60 f.

Coorientador(a): João Batista dos Santos Garcia.

Orientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Saúde do Adulto/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís - MA, 2020.

1. Dor. 2. Inflamação. 3. Mecanismo de Ação. 4. Persea americana. I. Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa. II. Garcia, João Batista dos Santos. III. Título.

TÁZIA LOPES DE CASTRO

**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO
DA *Persea americana* Mill.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Grau de Mestre em Saúde do Adulto.

A Banca Examinadora da defesa de mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: 19/02/2020.

Prof.^a Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Orientador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Thiago Alves Rodrigues (Examinador)

IES ou PPG de fora do PPGSAD

Prof.^a Dra. Haíssa Oliveira Brito (Examinador)

Universidade Federal do Maranhão

Prof. Dr. Marcelo Souza de Andrade (Examinador)

Universidade Federal do Maranhão

“Considera apenas o trabalho e não a recompensa por ele. Que o teu motivo para as ações não seja a recompensa. Tampouco te entregues à inatividade”

Bhagavad Gita

Dedico este trabalho à minha mãe, Cláudia Regina Lopes de Castro*, por sempre me incentivar à busca pelo conhecimento.

* *In memoriam*

AGRADECIMENTOS

À minha querida mãe, Cláudia Regina Lopes de Castro (*In memoriam*), que sempre me incentivou e inspirou a ser alguém melhor. Por desde cedo me mostrar que a educação é uma ferramenta para grandes mudanças. És eterna em mim.

Ao meu pai, Oscar Santos de Castro, e irmãos, Igor Lopes de Castro e Maíra Lopes de Castro, por representarem a certeza de que nunca estarei sozinha. Juntos sempre seremos mais fortes.

À minhas avós (Sônia e Dadá), tios e primos, pelo apoio incondicional. Em vocês sempre tenho um lar para retornar.

À minha orientadora e eterna professora, Maria do Socorro Cartágenes, pelo apoio e ensinamentos repassados durante toda a minha trajetória acadêmica. Obrigada por acreditar em mim.

A toda família LEED, por terem feito parte de tantos momentos na minha vida, compartilhado dificuldades e comemorado alegrias, sempre lembrando que, pesquisa e ciência, não se fazem sozinhas.

Aos meus queridos amigos, Breno Facundes e Priscylla Gouveia. Sem vocês, o caminho teria sido muito mais difícil. Obrigada por estarem ao meu lado em todos os momentos. Minha eterna gratidão e carinho.

Às minhas queridas IC's, Carol, Letícia, Beatriz, por estarem abertas ao conhecimento e terem doado muitos finais de semana em prol da ciência. O futuro de vocês será brilhante.

Aos amigos que compartilham a vida comigo. É muito bom saber que vocês continuam ao meu lado em mais uma etapa importante da minha vida. Isolda Ribeiro, Renara Mello, Manuela Itamar, Roberta Gondim, Valdemy Junior, Jéssica Fadul.

A cada ser de luz, que através de orações, carinho e proteção, me guiaram até aqui.

À Filosofia, por abrir portas e possibilitar grandes mudanças em mim.

Aos animais que são utilizados em experimentos laboratoriais, em especial neste trabalho em questão. Meu eterno respeito a cada vida.

Às instituições de fomento à pesquisa, em especial a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES. Obrigada por ainda acreditarem que a pesquisa e ciência são ferramentas essenciais para o desenvolvimento social.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	15
2	REFERENCIAL TEÓRICO	18
	2.1 Espécie vegetal: <i>Persea americana</i> Mill.	18
	2.2 Dor	21
	2.3 Inflamação	25
	2.4 Via L-arginina-óxido nítrico.....	26
	2.5 Via alfa-2-adrenérgica.....	27
	2.6 Sistema muscarínico.....	28
	2.7 Via opioide.....	28
3	OBJETIVOS.....	30
	3.1 Objetivo Geral	30
	3.2 Objetivos Específicos	30
4	ARTIGO	31
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
	ANEXO A – Certificado de Autorização CEUA.....	56
	ANEXO B – Certificado de tombo de exsicata	57
	APÊNDICE A – Esquema ilustrativo do processamento da espécie vegetal	58
	APÊNDICE B – Esquema do protocolo experimental Teste de Formalina.....	59
	APÊNDICE C – Esquema do protocolo experimental Teste de Edema de Pata.....	60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteróides
CEUA	Comissão de ética em uso de animais
F.PaAcet	Fração Acetato de Etila da <i>Persea americana</i> Mill.
F.PaBut	Fração Butanólica da <i>Persea americana</i> Mill.
IASP	International Association for the Study of Pain
I.P.	Intraperitoneal
LEED	Laboratório experimental para Estudo da Dor
L-NMMA	N ^G -monometil-L-arginina
L-NNA	N ^G -nitro-L-arginina
L-NAME	N ^G -nitro-L-arginina-metil-éster
MAR	Herbário do Maranhão
MG	Miligrama
NADPH	Fosfato de Dinucleótido de Adenina e Nicotinamida
NOS	Óxido Nítrico Sintases
NO	Óxido Nítrico
S.C.	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
V.O.	Via oral

LISTA DE SIMBOLOS

cm	centímetro
g	gramas
kg	kilograma
l	litros
m	metro
%	porcentagem
µl	microlitro
ml	mililitro
V	volume

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Figura 1. *Persea americana* Mill. coletada em zona rural do município da Raposa – Maranhão, Brasil. Fonte: BONFIM, 2019..... 20
- Figura 2. Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central. Fibras nervosas aferentes primárias A β , A δ e C cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) que transmitem impulsos da periferia ao corno dorsal da medula. Fonte: Griffin e Woolf (2009)23
- Figura 3. Escada Analgésica da OMS: Degraus do Tratamento da Dor Nociceptiva e Mista. Fonte: OMS, 2012.....24
- Figura 4. Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina. Fonte: Flora Filho; Zilberstein, 2000.....26
- Figura 5. Efeito do pré-tratamento com L-NAME (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p=0,0190 versus controle negativo na fase neurogênica; **p<0,0001 e p<0,0002 versus F.PaAcet e controle negativo na fase inflamatória; ***p<0,0001 versus F.PaAcet e controle negativo na fase inflamatória.....39
- Figura 6. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p=0,0007 versus fase inflamatória do grupo F.PaAcet; **p<0,0001, p=0,0256, p=0,0069 e p<0,0001 versus fase inflamatória do grupo F.PaAcet, fase neurogênica do grupo F.PaBut, fase inflamatória do grupo clonidina e fase inflamatória do grupo controle negativo, respectivamente; ***p=0,0046 e p=0,0128 versus grupo acetato e controle negativo na fase inflamatória.....40
- Figura 7. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way

ANOVA. *p<0,05 versus F.PaBut, controle positivo e controle negativo na fase inflamatória.....	41
Figura 8. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da <i>Persea americana</i> Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p<0,0001 versus F.PaAcet, F.PaBut e controle negativo na fase inflamatória.....	42
Figura 9. Efeito das F.PaBut e F.PaAcet (50 mg/Kg,v.o.), L-arginina (600 mg/Kg,i.p.) e Veículo (NaCl 0,9%,v.o.) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** p<0,0001 comparando F.PaAcet versus grupo veículo; ##### p<0,0001 e ## p=0,0011 comparando F.PaAcet versus grupo L-arginina; @@ p=0,0097 e @@@@ p<0,0001 comparando F.PaBut versus grupo L-arginina.....	43
Figura 10. Efeito das F.PaBut e F.PaAcet (50 mg/Kg,v.o.), Clonidina (0,1mg/Kg,i.p.) e Veículo (NaCl 0,9%,v.o.) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** p<0,0001 comparando F.PaBut versus grupo veículo; # p=0,0203 comparando F.PaBut versus grupo clonidina; @@@@ p<0,0001 comparando F.PaAcet versus grupo veículo.....	44

RESUMO

Segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor, a dor é definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões” e busca-se, cada vez mais, alternativas terapêuticas para o seu manejo. Tendo em vista a quantidade de propriedades e constituintes presentes na *Persea americana*, essa se torna alvo de estudos experimentais com a finalidade de validar as informações acerca da espécie no seu uso popular, possuindo na literatura estudos que descrevem propriedades anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso de suas folhas. O objetivo do estudo foi investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da fração acetato de etila (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da espécie vegetal. Avaliou-se a participação da via opioide, L-arginina-óxido nítrico, α -adrenoreceptores e sistema muscarínico na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações através do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata por carragenina. As F.PaAcet e F.PaBut apresentaram ação anti-inflamatória significativa nas doses e concentrações testadas. No teste de formalina, ao avaliar a via opioide, apenas o grupo controle positivo (CP) apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambertura na fase inflamatória, quando comparado aos demais grupos. Na via L-NAME-Óxido Nítrico, o grupo CP e F.PaBut apresentaram uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambertura na fase inflamatória, quando comparado à aos demais grupos. Na via α -2 adrenérgica, a F.PaBut apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambertura na fase inflamatória, quando comparado aos demais grupos. No teste de edema de pata, a F.PaBut foi capaz de reduzir o edema nos tempos 60 e 120 minutos, ao avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico e apenas no tempo 240 minutos ao avaliar a via alfa-2-adrenérgica. Já a F.PaAcet reduziu o edema desde o tempo 60 minutos até o final do teste, ao avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico e apenas no tempo 240 minutos ao avaliar a via alfa-2-adrenérgica. Sugere-se que as frações tenham suas atividades associadas a modulação da liberação de NO, assim como a modulação da liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos na fase inflamatória do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata induzido por carragenina, associado a inibição da liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, indicando uma potencial utilização da espécie vegetal na elaboração de fármacos para tratamento de doenças inflamatórias

Palavras-chave: *Persea americana*; Mecanismo de Ação; Dor; Inflamação.

ABSTRACT

According to the International Association for the Study of Pain, pain is defined as “an unpleasant sensory and emotional experience associated with real or potential tissue damage, or described in terms of such injuries” and therapeutic alternatives are increasingly sought for their management. In view of the amount of properties and constituents present in *Persea americana* Mill., it becomes the target of experimental studies in order to validate the information about the species in its popular use, having in the literature studies that describe anti-inflammatory and analgesic properties of the extract watery of its leaves. The aim of the study was to investigate the possible mechanisms involved in the antinociceptive action of the ethyl acetate (F.PaAcet) and butanolic (F.PaBut) fraction of the plant species. The participation of the opioid pathway, L-arginine-nitric oxide, α -adrenoreceptors and muscarinic system in the antinociceptive and anti-inflammatory activity of the fractions was evaluated through the formalin-induced nociception test and carrageenan paw edema. F.PaAcet and F.PaBut showed significant anti-inflammatory action in the tested doses and concentrations. In the formalin test, when evaluating the opioid pathway, only the positive control group (CP) showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the licking time in the inflammatory phase, when compared to the other groups. In the L-NAME-Nitric Oxide pathway, the CP and F.PaBut group showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the licking time in the inflammatory phase, when compared to the others groups. In the α -2 adrenergic pathway, F.PaBut showed a statistically significant difference ($p < 0.05$) in the licking time in the inflammatory phase, when compared to the other groups. In the paw edema test, F.PaBut was able to reduce the edema in 60 and 120 minutes, when evaluating the participation of the L-arginine-nitric oxide pathway and only in 240 minutes when evaluating the α -2-adrenergic pathway. F.PaAcet reduced edema from 60 minutes until the end of the test, when evaluating the participation of the L-arginine-nitric oxide pathway and only in 240 minutes when evaluating the α -2-adrenergic pathway. It's suggested that the fractions have their activities associated with the modulation of NO release, as well as the modulation of the release of noradrenaline from the sympathetic terminals in the inflammatory phase of the formalin-induced nociception test and carrageenan-induced paw edema, associated with inhibition of release of inflammatory mediators, such as histamines, serotonin, bradykinin and prostaglandins, indicating a potential use of the plant species in the preparation of drugs for the treatment of inflammatory diseases.

Key-words: *Persea americana*; Mechanism of Action; Pain; Inflammation.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como sendo uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual (PORTNOI, 2014). Em condições fisiológicas, constitui um mecanismo protetor do organismo que o alerta para lesões, levando-o à ativação de reflexos para minimizar os danos provocados ao organismo (SCHOELLER, 2016).

O mecanismo de nocicepção envolve agressões ou lesões teciduais que resultam na liberação de inúmeros mediadores químicos, capazes de ativar ou sensibilizar nociceptores. Os nociceptores são receptores periféricos de alto limiar, ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos que atuam em conjunto com as fibras nervosas na transmissão da informação ao sistema nervoso central (SNC) (ROCHA et al, 2007). As fibras nervosas, A-delta(mielínicas) e C (amielínicas), sofrem transdução pelo estímulo nocivo, os quais são transmitidos pelos gânglios da raiz dorsal da medula, tálamo e córtex somatossensorial através da via neoespinotalâmica, considerada a principal via de condução da informação dolorosa (GOOLAN et al, 2009; NAIME, 2013)

A terapia convencional para o controle da dor, principalmente no que diz respeito ao tratamento/controle de estados crônicos de dor, se baseia no uso de analgésicos opioides, antiinflamatórios não-esteroidais, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. Todavia, os efeitos indesejáveis promovidos por esses fármacos oferecem obstáculos à utilização dos mesmos na terapêutica (ATTAL et al., 2010). No processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, os recursos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importante fonte de drogas. Em virtude de uma biodiversidade extensa e ainda não desbravada a busca por espécies vegetais, as quais, em grande maioria, já são utilizadas pela população baseada no senso comum, tem sido alvo de estudos científicos e testes para as mais variadas patologias e até melhora de sinais e sintomas característicos de doenças, como a dor (BARREIRO, 2009).

A espécie *Persea americana* Mill, pertencente à família Lauraceae é integrante das florestas de natureza tropical, onde é árvore de folhas perenes, com nome popular de abacateiro, e tem seu fruto conhecido como abacate (TESKE; TRENTINI,1996). Este, tem sido descrito como matéria-prima na preparação de emulsões para os tratamentos de pele seca, agentes protetores contra a radiação ultravioleta, compostos antioxidantes e anti-envelhecimento (BARREIRO; BOLZAN, 2013).Estudos demonstraram que as folhas exibem propriedades antiinflamatórias (ADEYEMI et al., 2002), antioxidantes, anticonvulsivante (OJEWOLE;AMABEOKU, 2006), hipoglicemiante (EZEJIOFOR et al, 2013, antifúngicas, antianêmica, antidiarreica e antiviral, quando estão presentes em extratos hidroalcoolicos, aquosos ou são preparadas por infusão (chás) (ALONSO, 2004; LORENZI; MATOS, 2008).

No Brasil, as preparações advindas desta espécie são utilizadas para o combate a problemas renais, ação diurética e antihipertensiva, vermífugo, tendo o caroço, folha e flor como as partes utilizadas pela população local (REGO, 1995.). Adeyemi e colaboradores (2002) demonstraram a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. americana* por meio de testes *in vitro*. Abubakar&Adamu (2013) evidenciaram ação do extrato das folhas de *Persea americana* em modelo de dor experimental (contorções abdominais induzidas por ácido acético) e reforçaram a necessidade de mais estudos acerca dos constituintes envolvidos neste efeito analgésico.

Um estudo recente realizado por Salehi *et al.* (2020), identificou também que insaponificáveis de abacate e soja, que constituem extratos vegetais feitos de frutas e sementes de abacate e óleo de soja, tem se mostrado uma alternativa terapêutica natural para osteoartrite, distúrbios autoimunes, reposição hormonal para mulheres em menopausa, além de efeitos anti-inflamatórios.

A espécie, *Persea americana* Mill., tornou-se alvo de estudo do Laboratório Experimental do Estudo da Dor (LEED) - UFMA, grupo qual faço parte e alguns trabalhos já evidenciaram a participação do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos, na diminuição a sensibilidade à dor, demonstrando efeitos antinociceptivos significativos nos testes para avaliação de atividade motora (Rotarod test), quantificação da dor espontânea pelo teste de Von-Frey adaptado

e resposta frente a hiperalgesia mecânica (Randall Selitto test) (BONFIM, 2019). Como também, um estudo realizado por Franca (2018), que avaliou a participação do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill e identificou sua atividade antinociceptiva e antioxidante na dor neuropática e ainda, inibição da atividade da COX 1 e COX 2, evidenciando maior potencial sobre a COX 2, demonstrando, assim, a ação inibitória do EHPA em via de síntese de mediadores inflamatórios. A ação antinociceptiva periférica do EHPa parece envolver receptores opioides e a modulação de óxido nítrico (LIMA, 2018).

Frente aos resultados já obtidos dentro do grupo de estudo e correlacionando com os encontrados na literatura, buscou-se investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva das frações acetato de etila e butanólica da *Persea americana* Mill, visto que se faz necessário mais estudos para compreensão da atividade analgésica associada aos compostos da *Persea americana* Mill.

2 REFERÊNCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie Vegetal: *Persea americana* Mill.

A *Persea americana* Miller (Figura 1), pertence à Família Lauraceae, gênero *Persea*, é comumente encontrada na América Central (LEITE et al., 2009). É nativo do México, Guatemala e Antilhas, onde são identificadas mais de 150 variedades, sendo comumente chamada de abacateiro no Brasil (ALVES, 2010).

A família Lauraceae, possui rara incidência nas regiões temperadas. Encontra-se amplamente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. É constituída de 50 gêneros, onde 22 são encontrados no Brasil. Em geral, as plantas dessa família são popularmente conhecidas como “canelas” e possuem alto valor ecológico e econômico (BARROSO et al., 2002).

O abacateiro possui porte médio-alto, variando de 12 a 25 metros. Desenvolve-se bem em regiões tropicais e subtropicais. A planta possui caule cilíndrico e lenhoso com coloração cinza escuro. Suas folhas não possuem estipulas, de pecíolo curto e alternadas e podem ter vários formatos como elíptico lanceoladas, oblongas, oblongo-lanceoladas ou ovais; podendo variar de 7 a 41 cm de comprimento. A cor da folha vai de bronzeada, quando nova, e, aos poucos, vai esverdeando. O fruto é uma baga com uma semente grande, cercada por uma polpa amanteigada (TEIXEIRA, 1995; KOLLER 2002).

As variedades cultivadas do abacateiro pertencem à mesma espécie botânica e foram classificadas de acordo com suas características em comum, em três subespécies (POPENOE, 1924). A subespécie mexicana, que possui plantas nativas do México, com maturação do fruto no verão, possuindo maior resistência ao frio; de fruta pequena; casca delgada, suave e lisa; de semente relativamente grande. Os principais representantes desta subespécie não possuem cultivo no Brasil, pois as características de seus frutos não satisfazem o mercado interno (CAMPOS, 1985). A subespécie guatemalense, representada por plantas nativas de regiões da Guatemala e sul do México, seu amadurecimento se dá no inverno e primavera, possui menos resistência ao frio; de fruta com tamanho mediano; casca grossa, dura, de superfície áspera e

rugosa, suas folhas não possuem odor particular. É cultivada no Brasil (CAMPOS, 1985 E KOLLER, 1992). E a subespécie antilhana, composta por plantas provenientes das regiões baixas dos trópicos, possuem maturação no verão e outono, é mais suscetível ao frio; o fruto é de tamanho médio a grande, porém de casca lisa e suave. (CAMPOS, 1985).

O México é o maior produtor mundial de abacate, produzindo anualmente cerca de 1.264.140 toneladas, seguido do Chile (368.568t), República Dominicana (295.081t) e Indonésia (275.953t) (AGRIANUAL, 2014). No Brasil o abacateiro é cultivado em quase todos os estados, devido às suas diversas variedades, trata-se de uma planta frutífera das mais produtivas por unidade de área cultivada (TANGO; TURATTI, 1992). A produção nacional em 2016 foi de 195 mil toneladas, em área de 10,8 mil hectares (IBGE, 2016).

Tradicionalmente, as folhas, fruto (abacate) e semente são conhecidos pelas suas propriedades antibacteriana, antifúngica, hipotensiva, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, hipolipêmica, amoebicidal e gliardicida (ADEYEMI et al., 2002; DING et al., 2007; RODRIGUEZ-CARPENA, 2011; JIMENEZ-ARELLANES, 2013).

Suas propriedades se devem principalmente aos constituintes presentes em suas folhas, semente e fruto, tais como fitosteróis, triterpenos, flavonóides, proantocianidinas, ácidos graxos, ácido furanóico, cumarinas, saponinas, taninos, entre outros (ADEYEMI et al., 2002; DING et al., 2007; RODRIGUEZ-CARPENA, 2011; JIMENEZ-ARELLANES, 2013; LU et al., 2005; LEITE et al., 2009; ADEBOYE et al., 1999). O fruto é comumente empregado em dietas com baixo nível de colesterol, devido a quantidade de nutrientes presentes em sua composição: minerais essenciais, potássio, vitamina B6, vitamina E e vitamina do complexo B (MASEKO, NKAMBULE & BOTHA 2006).



Figura 1. *Persea americana* Mill. coletada em zona rural do município da Raposa – Maranhão, Brasil. Fonte: BONFIM, 2019.

Adeyemi e colaboradores (2002) demonstraram a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. americana*, em que obteve seus melhores resultados na dose de 800mg/kg de peso do animal. Abubakar & Adamu (2013) evidenciaram ação do extrato das folhas de *P. americana* em modelo de dor experimental (contorções abdominais induzidas por ácido acético) e reforçaram a necessidade de mais estudos acerca dos constituintes envolvidos neste efeito analgésico. Hernandez et al (2014) em testes pré-clínicos de nocicepção evidenciou a ação analgésica periférica e central de *P. americana* nas doses 1, 5 e 10g/kg de peso do animal.

A espécie faz parte da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que é constituída de espécies vegetais com potencial de avançar nas etapas da cadeia produtiva e de gerar produtos de interesse do Ministério da Saúde do Brasil. Tendo em vista a quantidade de propriedades e constituintes presentes na *Persea americana*, essa se torna alvo

de estudos experimentais com a finalidade de validar as informações acerca da espécie no seu uso popular.

2.2 Dor

De acordo com a IASP, *International Association for the Study of Pain* (Associação Internacional de Estudos da Dor) a dor é uma experimentação de sentimentos desconfortáveis, tanto físicos como emocionais ligados a algum potencial ou concreto dano (PORTNOI, 2014).

No Brasil, a dor crônica é condição clínica bastante freqüente, estimando-se que 50% das consultas médicas estão relacionadas à dor crônica e que 50% dos doentes que a vivenciam podem tornar-se incapacitados por ela (ROSSETTO, 1999). Na cidade de São Luis, capital do Maranhão, Brasil, um estudo conduzido por Vieira (2012) utilizou 1597 voluntários e estimou que a prevalência de dor crônica seja de 42% e que 10% da população apresente algum tipo de dor neuropática.

A dor caracteriza-se por uma resposta protetora do organismo, visto que alerta o indivíduo para uma lesão possível ou real dos tecidos, que leva ao surgimento de respostas que possuem como finalidade o controle de uma potencial lesão tecidual (VITOR, 2008).

A dor pode ser classificada em aguda (inferior a 30 dias), quando possui caráter fisiológico, podendo ser ocasionadas por lesão corporal, queimaduras, infecções, entre outras. Ou crônica, quando sua ocorrência é superior a 30 dias. Também podem ser divididas segundo seu mecanismo fisiopatológico em dor nociceptiva através da ativação fisiológica dos nociceptores (CUSTODIO, 2008) mas também pode ser ativada por componentes psicológicos e subjetivos, ou seja, cada ser humano reage à dor de maneira diferente e com intensidades variadas (PEIXOTO, 2011).

A nocicepção consiste em um processo neural de codificação e processamento de um estímulo nocivo. Sendo esta composta por etapas de modulação, transmissão e transdução dos sinais neurais desencadeados por estímulos nocivos externos. Ocorre primeiramente a transformação dos estímulos ambientes externos, que podem ser físicos, químicos ou térmicos, em

potenciais de ação, sendo estes transferidos das fibras nervosas periféricas, para o SNC. Essa transformação é chamada de transdução e é mediada por nociceptores que se apresentam como terminações nervosas livres. A partir da aplicação de um estímulo nocivo, ocorre a ativação dos nociceptores e a informação de um potencial dano é encaminhada ao SNC. (ALVES, 2017).

A Figura 2 demonstra a transmissão do potencial de ação gerado pelo estímulo da dor até o córtex. As terminações nervosas das fibras A δ e C, possuem a aptidão para traduzir estímulos agressivos de natureza térmica, chamados de termocetores. Quando traduzem estímulos químicos denominam-se nociceptores; e quando traduzem estímulos mecânicos, mecanocetores. Esses receptores levam a informação até o sistema nervoso central e o córtex cerebral fará a interpretação como dor. As fibras A δ são mielinizadas e as C amielínicas (sem mielina) e transmitem estímulos dolorosos em velocidades distintas. As que possuem bainha de mielina transferem mais rapidamente a informação; enquanto as sem mielina conduzem de maneira mais lenta (ROCHA, 2007).

Dada à natureza complexa da dor com a participação de aspectos físicos, cognitivos, psicológicos e comportamentais, o tratamento da dor é multimodal, envolvendo reabilitação física e psicológica, tratamento farmacológico, mudanças no estilo de vida ou até intervenções cirúrgicas (DALE & STACEY, 2015).

O tratamento medicamentoso das dores nociceptiva e mista, devem ir de acordo com o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica (2012), proposto pela Organização Mundial da Saúde, que consiste em um escalonamento de medicações, incluindo analgésicos, anti-inflamatórios, fármacos adjuvantes (antidepressivos ou relaxantes musculares) e opioides (fracos e fortes), (Figura 3) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

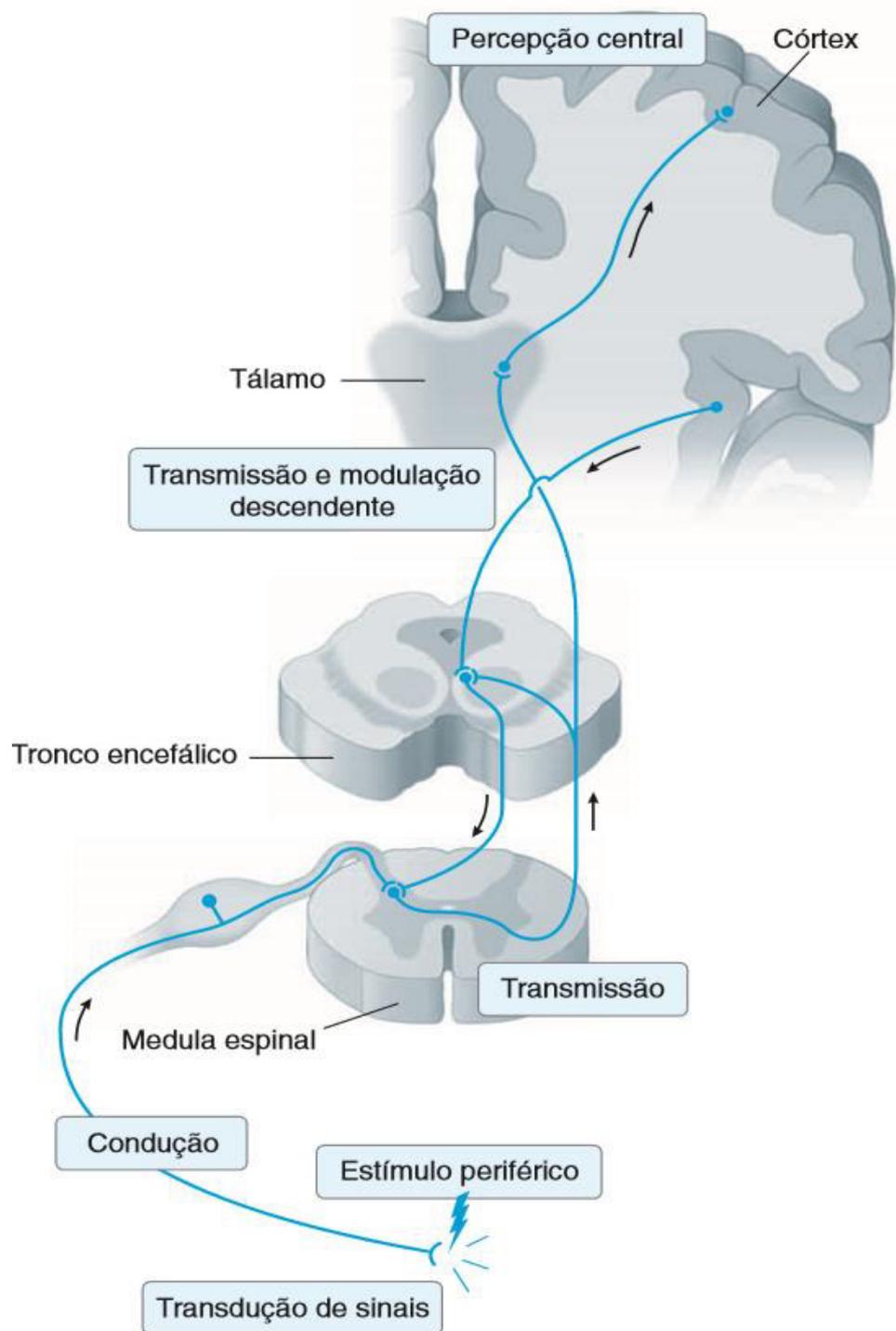


Figura 2. Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central. Fibras nervosas aferentes primárias A β , A δ e C cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) que transmitem impulsos da periferia ao corno dorsal da medula. Fonte: Griffin e Woolf (2009)

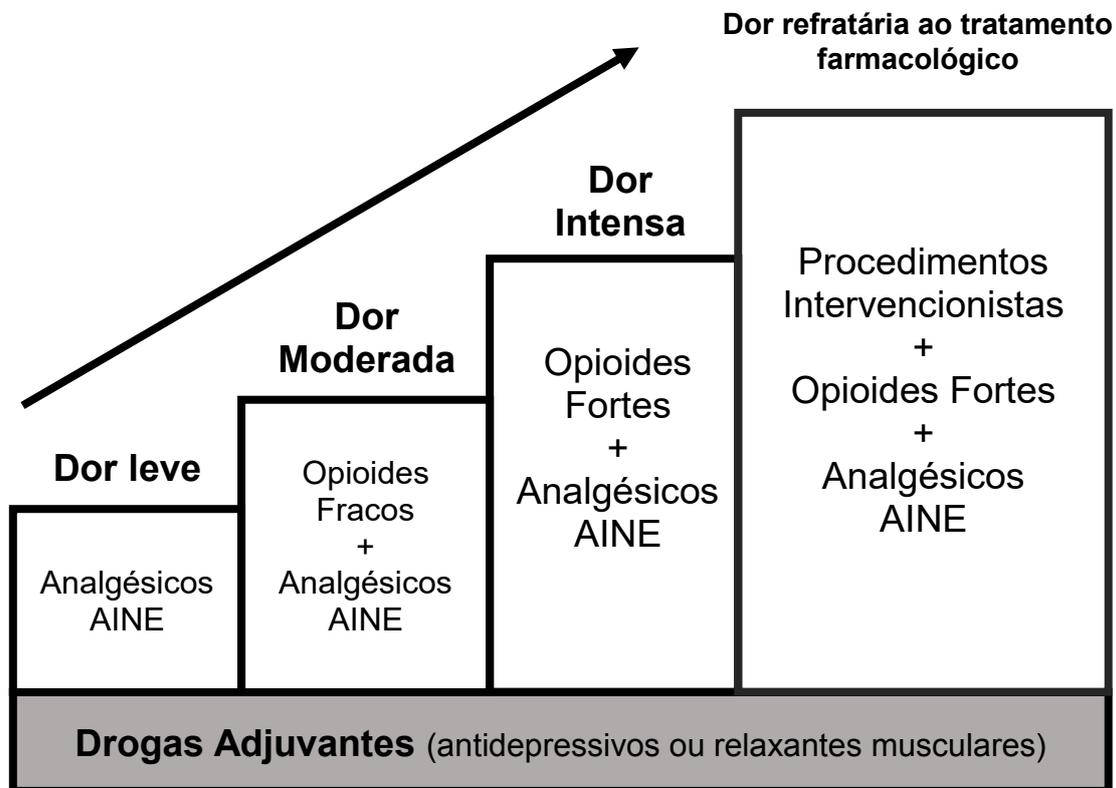


Figura 3. Escada Analgésica da OMS: Degraus do Tratamento da Dor Nociceptiva e Mista. Fonte: OMS, 2012.

A dor, quando não tratada de maneira adequada, afeta diretamente a qualidade de vida dos doentes e de seus familiares em todas as dimensões: física, psicológica, social e espiritual (FERREL, 1991). Para obtenção no sucesso do manejo da dor, é necessária uma avaliação minuciosa de sua natureza, o conhecimento dos diferentes tipos e padrões de dor, como também das possibilidades de tratamento (DE CASTRO, 2013).

2.3 Inflamação

O processo inflamatório ocorre como uma resposta do tecido à injúria celular e caracteriza-se por um fenômeno complexo, dinâmico e mediados por diversos fatores, podendo manifestar-se a partir de qualquer agente lesivo, físico, biológico ou químico, que envolve uma cascata de eventos bioquímicos e celulares, incluindo extravasamento de fluídos, ativação enzimática, migração celular, liberação de mediadores, sensibilização e ativação de receptores, lise tecidual e de reparo (CARVALHO & LEMONICA, 1997).

Os mediadores pré e pró-inflamatórios originários do exsudato e do infiltrado celular durante a inflamação, são de grande relevância terapêutica, sendo estes inibidos ou estimulados e possibilitando o controle dos sinais e sintomas do processo infeccioso (XVII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2013)

As respostas inflamatórias ocorrem em três fases, a aguda, caracterizada por vasodilatação local transitória e aumento da permeabilidade capilar; a fase subaguda tardia, caracterizada por infiltração de leucócitos e células fagocitárias; e a fase proliferativa crônica, em que ocorrem a degeneração e fibrose do tecido (GOODMAN & GILMAN, 2010).

A reação inflamatória aguda caracteriza-se por uma série de eventos que se relacionam, entre os quais aumento no fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluido (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios dos vasos sanguíneos para dentro do tecido, formação de tecido de granulação e reparo tecidual, incluindo a participação de diferentes tipos celulares, como neutrófilos, macrófagos, mastócitos, tinócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos, entre outras. As primeiras células a chegar ao tecido que sofreu injúria são os neutrófilos e, subseqüentemente, os macrófagos teciduais (LIMA et al., 2007).

A infiltração de neutrófilos ocorre através de proteínas transmembranas, as selectinas e intreginas, que permitem o rolamento e a adesão dos neutrófilos ao longo da parede do capilar e do endotélio inflamado, além de coordenarem a

transmigração através da membrana basal. Posteriormente, os monócitos migram para o local inflamado, sofrem diferenciação para macrófagos e promovem a remoção de detritos e neutrófilos apoptóticos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

Em geral, a resposta inflamatória aguda é benéfica e persiste por um curto período de tempo, a partir de mecanismos que levam a reparação do dano e homeostase. Entretanto, estados de agressão persistente, aumentam os riscos de danos celulares, resultando em respostas fisiológicas anormais e ao desenvolvimento de estados inflamatórios crônico (KAULMANN; BOHN, 2014).

2.4 Via L-arginina-óxido nítrico

A L-arginina é um aminoácido que está envolvido em diversos processos metabólicos, como por exemplo na formação de creatina, que é o precursor da creatinina, no ciclo da uréia, na produção de proteínas e síntese de pirimidinas. Em 1987, foi evidenciado a sua participação como precursor do óxido nítrico (NO), sendo este um gás inorgânico que está relacionado a funções fisiológicas e patologias. O NO é formado a partir de um aminoácido, L-arginina, que sofre uma reação catalizada por uma família de enzimas, a óxido nítrico sintases (NOS), convertendo L-arginina em L-citulina e NO, necessitando da presença de dois co-substratos, o oxigênio e o fosfato dinucleótido adenina nicotinamida (NADPH), (Figura 4) (BRUNINI et al.,2006).

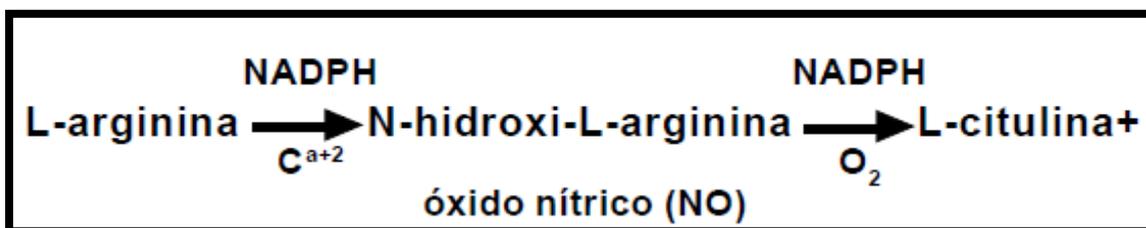


Figura 4. Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina. Fonte: Flora Filho; Zilberstein, 2000.

A síntese enzimática de citrulina pode ser inibida por análogos da L-arginina, como N^G-monometil-L-arginina (L-NMMA), N^G-nitro-L-arginina (L-NNA) e N^G-nitro-L-arginina-metil-éster (L-NAME). Estes inibidores são utilizados em pesquisas para entendimento do efeito do NO nos tecidos, visto que inibem a produção do NO e conseqüentemente, os efeitos desencadeados pela sua presença (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000).

O NO está envolvido em diversos processos fisiológicos e estudos sugerem sua complexa participação na modulação da dor. Este é um importante neurotransmissor envolvido no processo nociceptivo e, no corno dorsal da medula espinhal, contribui para o desenvolvimento da sensibilização central. Além disso, dados experimentais também demonstraram que o NO inibe a nocicepção no sistema nervoso periférico e no sistema nervoso central (CURY et al., 2011).

2.5 Via alfa-2-adrenérgica

Os alfas-2-adrenorreceptores possuem uma estrutura similar à maioria dos outros receptores neuronais, incluindo outros receptores adrenérgicos como alfa-1, beta, muscarínico, dopamina, opioide, adenosina e serotonina. Essas características estruturais dos receptores estão relacionadas com as respostas adrenérgicas, principalmente na ligação funcional com os nucleotídeos de guanina (proteína G). Os alfas-2-adrenorreceptores podem ser encontrados em regiões cerebrais, central e periféricas, como também, em tecidos hepáticos, renais e pancreáticos, exercendo funções fisiológicas. (BAGATINI et al., 2002).

O mecanismo de ação dos agonistas alfa-2 consiste está relacionado com a estimulação dos receptores alfa-2 adrenérgicos, que impedem a liberação de noradrenalina central e periférica pela inibição do influxo de íons cálcio na membrana neuronal, diminuindo a excitação do Sistema Nervoso Central (SNC). Dessa forma, esse grupo farmacológico proporciona efeitos calmante, analgésico, miorelaxante e redutor da capacidade de responder a estímulos, além de induzir hipotermia e bradicardia (CAIRES & CLARK, 2014).

Devido suas propriedades analgésicas, essa classe é uma alternativa ao uso dos opioides, via epidural, sendo utilizados principalmente em casos de dor

neuropática e em pacientes com dores resistentes aos opioides. Por possuírem menos efeitos adversos, como ausência de depressão respiratória, prurido, vômito e dependência, se tornam uma alternativa terapêutica quando comparado ao uso de opioides (BRONDANI et al., 2004). Seus efeitos podem ser revertidos por fármacos antagonistas, como a ioimbina e atipamezole (V SIMPÓSIO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CENTRO UNIVERSITÁRIO CESMAC, 2015).

2.6. Sistema muscarínico

Assim como outros receptores da superfície da membrana celular, como exemplo os adrenérgicos, os receptores muscarínicos traduzem sinais pela membrana celular e interagem com as proteínas de ligação de GTP (GOOLAN, 2009).

Se tem identificado 5 subtipos de receptores muscarínicos (M1, M2, M3, M4 e M5) que apresentam ampla distribuição no sistema nervoso central, sendo também, encontrados em tecidos periféricos, como coração, glândulas endócrinas e exócrinas, fibras musculares lisas digestivas e placenta (ROMERO et al., 20019).

O controle parassimpático da inflamação consiste no arco reflexo da inflamação, que transmite informações da periferia para o sistema nervoso central, objetivando a regulação inflamatória. Esse arco reflexo, é uma via neural aferente sensorial e um arco neural motor eferente que transmite informações para que ocorra a modulação das respostas imunes (MIRANDA, 2016).

Os agonistas e antagonistas dos receptores muscarínicos são utilizados como moduladores das respostas autônomas de órgãos efetores, influenciando na atividade da acetilcolina, que possui como efeitos analgesia, de despertar e atenção (GOOLAN, 2009).

2.7 Via opioide

Os opioides possuem sua ação analgésica mediada através da interação com os receptores opioides ($M\mu$, Delta e Kappa), estando esses localizados principalmente no sistema nervoso central, embora na presença de inflamação

eles possam se expressar no sistema nervoso periférico, podendo seus efeitos serem antagonizados pela naloxona (MIRANDA, 2016).

Seus efeitos farmacológicos são atribuídos à ativação de receptores localizados na camada superficial do corno dorsal da medula espinhal. Os receptores do tipo mu, nos subtipos mu-1 e mu-2, distribuem-se ao longo de toda a medula espinhal, já os receptores delta estão restritos aos segmentos cervicais. Esses dois tipos de receptores são responsáveis pela inibição dose-dependente das respostas aos estímulos termocutâneos. Os receptores kappa estão localizados no segmento lombo-sacral da medula espinhal e estão relacionados à potente supressão da resposta aos estímulos químicos viscerais, mas não interferem na nocicepção somática (VALADÃO, DUQUE & FARIAS, 2002).

Os opioides representam o principal sistema de controle periférico e central da dor. Apresentam uma elevada distribuição de receptores no corno dorsal da medula espinhal- lâminas I e II (MERRER et al., 2009) e por isso é um importante alvo para caracterização farmacológica de substâncias.

Os peptídeos opioides (β -endorfina, encefalinas e dinorfinas) agem sobre os receptores μ , δ e κ , acoplados a proteína G, que quando ativados inibem a adenilato ciclase, subsequentemente reduz o influxo de cálcio, aumenta o fluxo de potássio, gerando redução na liberação de neurotransmissores excitatórios pré-sinápticos e hiperpolarização pós-sináptica (STEIN, 2013). Além disso, parte da resposta inibitória do sistema é atribuída pela desativação do sistema noradrenérgico no cérebro e ativação de receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinhal (VO et al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva das frações acetato de etila e butanólica de *Persea americana* Mill.

3.2 Específicos

- Avaliar, no efeito antinociceptivo das frações de *Persea americana* Mill:
 - 1) a participação da via opioide
 - 2) a participação da via L-arginina - óxido nítrico
 - 3) a participação dos alfa-adrenoreceptores
 - 4) a participação do sistema muscarínico

4 ARTIGO

Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e anti-inflamatório de frações da *Persea americana* Mill.

Tázia Lopes de Castro¹, Breno Facundes Bonfim¹, Priscylla Gouveia Mendonça¹, Lilalea Gonçalves França¹, João Batista Santos Garcia¹ e Maria do Socorro de Sousa Cartágenes¹

¹Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão – São Luís – Maranhão – Brasil.

RESUMO

Segundo a Associação Internacional para Estudos da Dor, a dor é definida como sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões” e busca-se, cada vez mais, alternativas terapêuticas para o seu manejo. Tendo em vista a quantidade de propriedades e constituintes presentes na *Persea americana*, essa se torna alvo de estudos experimentais com a finalidade de validar as informações acerca da espécie no seu uso popular, possuindo na literatura estudos que descrevem propriedades anti-inflamatória e analgésica do extrato aquoso de suas folhas. O objetivo do estudo foi investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva da fração acetato de etila (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da espécie vegetal. Avaliou-se a participação da via opioide, L-arginina-óxido nítrico, α -adrenoreceptores e sistema muscarínico na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações através do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata por carragenina. As F.PaAcet e F.PaBut apresentaram ação anti-inflamatória significativa nas doses e concentrações testadas. No teste de formalina, ao avaliar a via opioide, apenas o grupo controle positivo (CP) apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambertura na fase inflamatória, quando comparado aos demais grupos. Na via L-NAME-Óxido Nítrico, o grupo CP e F.PaBut apresentaram uma diferença estatisticamente

significante ($p < 0,05$) no tempo de lambedura na fase inflamatória, quando comparado à aos demais grupos. Na via α -2 adrenérgica, a F.PaBut apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambedura na fase inflamatória, quando comparado aos demais grupos. No teste de edema de pata, a F.PaBut foi capaz de reduzir o edema nos tempos 60 e 120 minutos, ao avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico e apenas no tempo 240 minutos ao avaliar a via alfa-2-adrenérgica. Já a F.PaAcet reduziu o edema desde o tempo 60 minutos até o final do teste, ao avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico e apenas no tempo 240 minutos ao avaliar a via alfa-2-adrenérgica. Sugere-se que as frações tenham suas atividades associadas a modulação da liberação de NO, assim como a modulação da liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos na fase inflamatória do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata induzido por carragenina, associado a inibição da liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, indicando uma potencial utilização da espécie vegetal na elaboração de fármacos para tratamento de doenças inflamatórias.

Palavras-chave: *Persea americana*; Mecanismo de Ação; Dor; Inflamação.

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor é definida como sendo uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a uma lesão tecidual (PORTNOI, 2014). Em condições fisiológicas, constitui um mecanismo protetor do organismo que o alerta para lesões, levando-o à ativação de reflexos para minimizar os danos provocados ao organismo (SCHOELLER, 2016).

O mecanismo de nocicepção envolve agressões ou lesões teciduais que resultam na liberação de inúmeros mediadores químicos, capazes de ativar ou sensibilizar nociceptores. Os nociceptores são receptores periféricos de alto limiar, ativados por estímulos mecânicos, térmicos e químicos que atuam em conjunto com as fibras nervosas na transmissão da informação ao sistema nervoso central (SNC) (ROCHA et al, 2007). As fibras nervosas, A-delta(mielínicas) e C (amielínicas), sofrem transdução pelo estímulo nocivo, os quais são transmitidos pelos gânglios da raiz dorsal da medula, tálamo e córtex somatossensorial através da via neoespinotalâmica, considerada a principal via de condução da informação dolorosa (GOOLAN et al, 2009; NAIME, 2013)

A terapia convencional para o controle da dor, principalmente no que diz respeito ao tratamento/controlado de estados crônicos de dor, se baseia no uso de analgésicos opioides, antiinflamatórios não-esteroidais, antidepressivos tricíclicos e anticonvulsivantes. Todavia, os efeitos indesejáveis promovidos por esses fármacos oferecem obstáculos à utilização dos mesmos na terapêutica (ATTAL et al., 2010). No processo de descoberta e desenvolvimento de novos compostos farmacologicamente ativos, os recursos naturais, especialmente de origem vegetal, representam importante fonte de drogas. Em virtude de uma biodiversidade extensa e ainda não desbravada a busca por espécies vegetais, as quais, em grande maioria, já são utilizadas pela população baseada no senso comum, tem sido alvo de estudos científicos e testes para as mais variadas patologias e até melhora de sinais e sintomas característicos de doenças, como a dor (BARREIRO, 2009).

A *Persea americana* Miller, pertencente à Família Lauraceae, gênero *Persea*, é comumente encontrada na América Central (LEITE et al., 2009). É nativo do México, Guatemala e Antilhas, onde são identificadas mais de 150 variedades, sendo comumente chamada de abacateiro no Brasil (ALVES, 2010). Tradicionalmente, as folhas, fruto e semente são conhecidos pelas suas propriedades antibacteriana, antifúngica, hipotensiva, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, hipolipêmica, amoebicida e gliardicida (ADEYEMI et al., 2002; DING et al., 2007; RODRIGUEZ-CARPENA, 2011; JIMENEZ-ARELLANES, 2013).

Estudos recentes tem identificado que insaponificáveis de abacate e soja tem se mostrado uma alternativa terapêutica natural para osteoartrite, distúrbios autoimunes, reposição hormonal para mulheres em menopausa, além de efeitos anti-inflamatórios (SALEHI et al., 2020). Como também, a participação do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em joelhos de ratos, na diminuição a sensibilidade à dor, demonstrando efeitos antinociceptivos significativos nos testes para avaliação de atividade motora (Rotarod test), quantificação da dor espontânea pelo teste de Von-Frey adaptado e resposta frente a hiperalgesia mecânica (Randall Selitto test) (BONFIM, 2019). Um estudo realizado por Franca (2018), avaliou a participação do extrato hidroetanólico das folhas de *Persea americana* Mill e identificou sua atividade antinociceptiva e antioxidante na dor neuropática e ainda, inibição da atividade da COX 1 e COX 2, evidenciando maior potencial sobre a COX 2, demonstrando, assim, a ação inibitória do EHPA em via de síntese de mediadores inflamatórios.

Frente aos resultados encontrados na literatura, buscou-se investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva das frações acetato de etila e butanólica da *Persea americana* Mill, visto que se faz necessário mais estudos para compreensão da atividade analgésica e anti-inflamatória associada aos compostos da *Persea americana* Mill.

2. METODOLOGIA

O estudo foi realizado no Laboratório Experimental para Estudo da Dor (LEED), localizado no campus do Bacanga da Universidade Federal do Maranhão. O projeto foi submetido à análise pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão, sendo aprovado pelo CEUA processo número 23115.015096/2017-75 (Anexo A).

2.1. COLETA E PROCESSAMENTO DA ESPÉCIE VEGETAL

A planta foi coletada na área rural do município de Raposa, Maranhão, nas coordenadas geográficas 2°28'21.6"S 44°09'14.3"W. Para contribuir com a identificação da mesma, que foi realizada pelo Herbário do Maranhão (MAR), vinculado ao departamento de biologia da Universidade Federal do Maranhão (Anexo B). A amostra vegetal foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura limite máxima de 38°C; e posteriormente trituradas em moinho de facas (tipo Willey, DeLeo®, EBD-5), resultando em 938,09 gramas de matéria prima pulverizada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O pó obtido foi submetido ao processo de extração por maceração fracionada com etanol 70%, na proporção de 1:3 (p/v), por período médio de 15 dias. Parte das soluções extrativas foram reservadas para análises químicas e o restante submetido à concentração sob pressão reduzida em rotaevaporador à pressão reduzida e à temperatura de 40° C, em seguida liofilizado. Deste processo foi obtido o extrato hidroalcolico (EAC). Em seguida, o EAC separadamente, foi dissolvido em metanol/água (80: 20 v/v) com agitação, a solução extrativa foi submetida à partição líquido-líquido usando acetato de etila e butanol. As soluções foram filtradas e concentradas em evaporador rotativo sob vácuo, para obtenção das frações acetato de etila (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) de *Persea americana* Mill (Apêndice A).

2.2. ANIMAIS

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* de aproximadamente 25-30g provenientes do Biotério central da Universidade Federal do Maranhão. Uma vez recebidos,

os animais foram alocados em gaiolas de polietileno (n= 5/ gaiola) no Biotério Setorial do Prédio de Pós-graduação de Ciências Biológicas e da Saúde, onde foram mantidos sob condições controladas de temperatura e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*.

2.3. AVALIAÇÃO DOS POSSÍVEIS MECANISMOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS DAS FRAÇÕES DE *Persea americana* Mill.

2.3.1. Nocicepção induzida por Formalina

No modelo de dor induzida por formalina (2,5 %), 20 µL do agente flogístico foram administrados por via intraplantar na pata traseira direita dos camundongos pré-tratados (20 minutos) com o antagonista da respectiva via em estudo e tratados (60 minutos) com as frações acetato de etila e butanólica (50mg/Kg;v.o) da espécie vegetal, agonista da via em estudo e veículo. O comportamento nociceptivo foi avaliado durante 30 minutos em duas fases distintas: 0 – 5 minutos (fase de dor neurogênica) e 15 – 30 minutos (fase de dor inflamatória), sendo determinado o tempo em segundos de lambertura na pata lesionada nestes dois intervalos (Hunskaar; Hole, 1987, Tjolsen et al., 1992). (Apêndice B).

2.3.1.1. Envolvimento do sistema opioide

Os animais foram pré-tratados com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração das frações da *Persea americana* Mill (50mg/Kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de nocicepção induzido por formalina.

2.3.1.2. Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico

Para avaliar a participação do sistema oxidonitrérgico na resposta antinociceptiva das frações da *Persea americana* Mill, os animais foram pré-tratados com L-NAME (50 mg/kg, i.p.). Após 20 minutos os animais receberam administração das frações da *Persea americana* Mill (50mg/Kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos

tratamentos os animais foram submetidos ao teste de nocicepção induzido por formalina.

2.3.1.3. Envolvimento do sistema α 2-adrenergico

Para avaliar a participação do sistema α 2-adrenergico sobre a atividade antinociceptivas frações da *Persea americana* Mill os animais foram tratados previamente com o antagonista dos adrenoceptores do tipo α 2, ioimbina (0.15mg/Kg, i.p.) 20 minutos antes da administração das frações da *Persea americana* Mill (50mg/Kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de nocicepção induzido por formalina.

2.3.1.4. Envolvimento do sistema muscarínico

Para avaliar a participação do sistema muscarínico na resposta antinociceptivas frações da *Persea americana* Mill os animais foram previamente tratados com atropina (5 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptores muscarínicos. Após 20 minutos foram tratados com as frações (50mg/Kg, v.o.), pilocarpina (5 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de nocicepção induzido por formalina.

2.3.2 Teste de edema de pata induzido por carragenina

O teste foi utilizado para avaliação da atividade farmacológica a partir da administração subplantar de carragenina. Os camundongos foram distribuídos randomicamente em grupos (n=6), pré-tratados (20 minutos) com o antagonista da respectiva via em estudo e tratados (60 minutos) com as frações acetato de etila e butanólica (50mg/Kg;v.o) da espécie vegetal, agonista da via em estudo e veículo. Após 60 minutos de tratamento, o edema de pata foi induzido pela administração subplantar de 50 μ L de carragenina 1% na pata direita do animal. O volume da pata do animal foi mensurado pelo pletismômetro digital (Modelo Ugo Basile, Verese-Itália) com 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a indução. O valor do edema foi obtido pela diferença entre o volume da pata direita e esquerda, sendo

expressos como a variação do volume da pata (mL) ao decorrer do tempo (Passos et al, 2007) (Apêndice C).

2.3.2.1. Envolvimento do sistema α 2-adrenergico

Para avaliar a participação do sistema α 2-adrenergico sobre a atividade anti-inflamatória frações da *Persea americana* Mill, os animais foram tratados previamente com o antagonista dos adrenoceptores do tipo α 2, ioimbina (0.15mg/Kg, i.p.) 20 minutos antes da administração das frações da *Persea americana* Mill (50mg/Kg, v.o.), clonidina (0,1 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de edema de pata induzido por carragenina.

2.3.2.2. Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico

Para avaliar a participação do sistema oxidonitrérgico na resposta antinociceptiva das frações da *Persea americana* Mill, os animais foram pré-tratados com L-NAME (50 mg/kg, i.p.). Após 20 minutos os animais receberam administração das frações da *Persea americana* Mill (50mg/Kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos depois dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de edema de pata induzido por carragenina.

2.4. ANÁLISE ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas usando teste two-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. Os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0.05$) foram consideradas estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prima 6®.

3. RESULTADOS

3.1. Teste de nociceção induzida por formalina

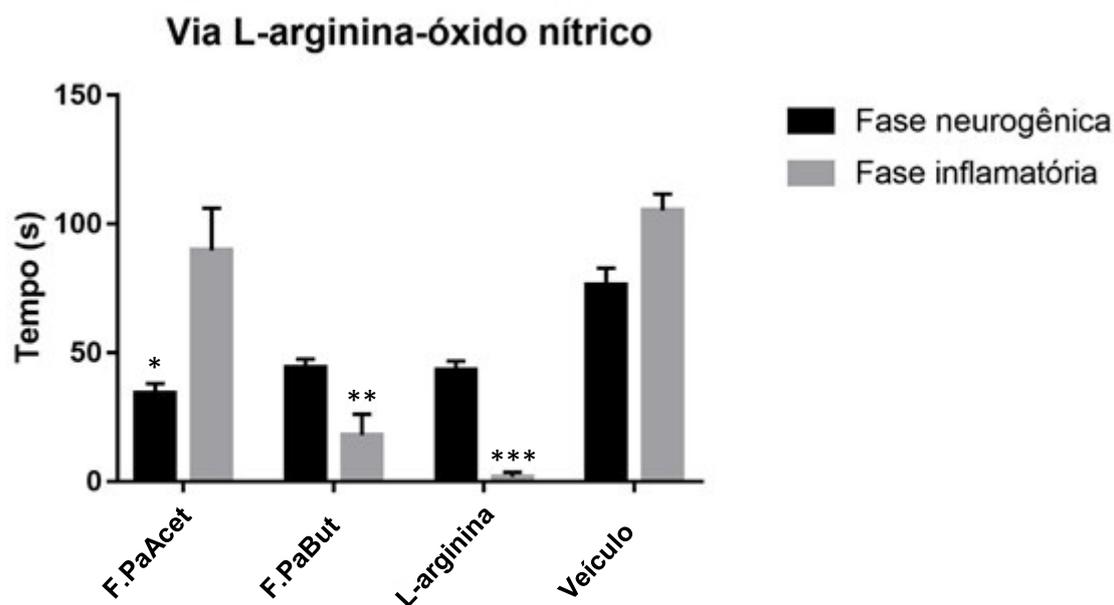


Figura 5. Efeito do pré-tratamento com L-NAME (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nociceção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p=0,0190 versus controle negativo na fase neurogênica; **p<0,0001 e p<0,0002 versus F.PaAcet e controle negativo na fase inflamatória; ***p<0,0001 versus F.PaAcet e controle negativo na fase inflamatória.

A fase 1 (neurogênica) do grupo F.PaAcet apresentou uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo veículo (p=0,0190), sugerindo que esta fração não atue por essa via, visto que estava na presença de L-NAME (antagonista da via) e ainda assim, apresentou diminuição do tempo de lambedura da pata lesionada (Figura 5).

A fase 2 (inflamatória) do grupo F.PaBut e L-arginina (agonista da via), apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo fração acetato (p<0,0001) e veículo (p<0,0002 e p<0,0001 respectivamente), apresentando um tempo de lambedura menor da pata lesionada (Figura 5).

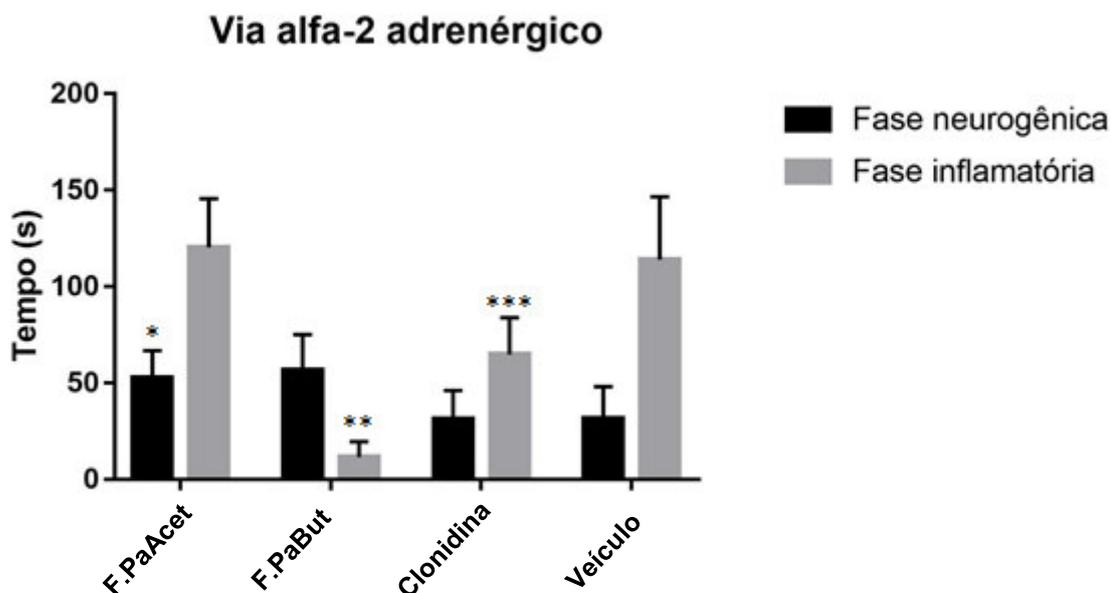


Figura 6. Efeito do pré-tratamento com ioimbina (0,15 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p=0,0007 versus fase inflamatória do grupo F.PaAcet; **p<0,0001, p=0,0256, p=0,0069 e p<0,0001 versus fase inflamatória do grupo F.PaAcet, fase neurogênica do grupo F.PaBut, fase inflamatória do grupo clonidina e fase inflamatória do grupo controle negativo, respectivamente; ***p=0,0046 e p=0,0128 versus grupo acetato e controle negativo na fase inflamatória.

A fase 2 (inflamatória) do grupo F.PaBut e clonidina (agonista da via) apresentaram uma diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo fração acetato (p<0,0001 e p=0,0046 respectivamente) e veículo (p<0,0001 e p=0,0128 respectivamente), apresentando um tempo de lambadura menor da pata, sugerindo assim, que o grupo F.PaBut atue por esta via de forma agonista, semelhante a clonidina, nas doses e concentrações testadas (Figura 6).

A fase 2 (inflamatória) do grupo F.PaBut apresentou uma diferença estatisticamente significativa (p=0,0069) em relação a fase 2 do grupo clonidina, apresentando um tempo de lambadura menor que a droga agonista padrão (Figura 6).

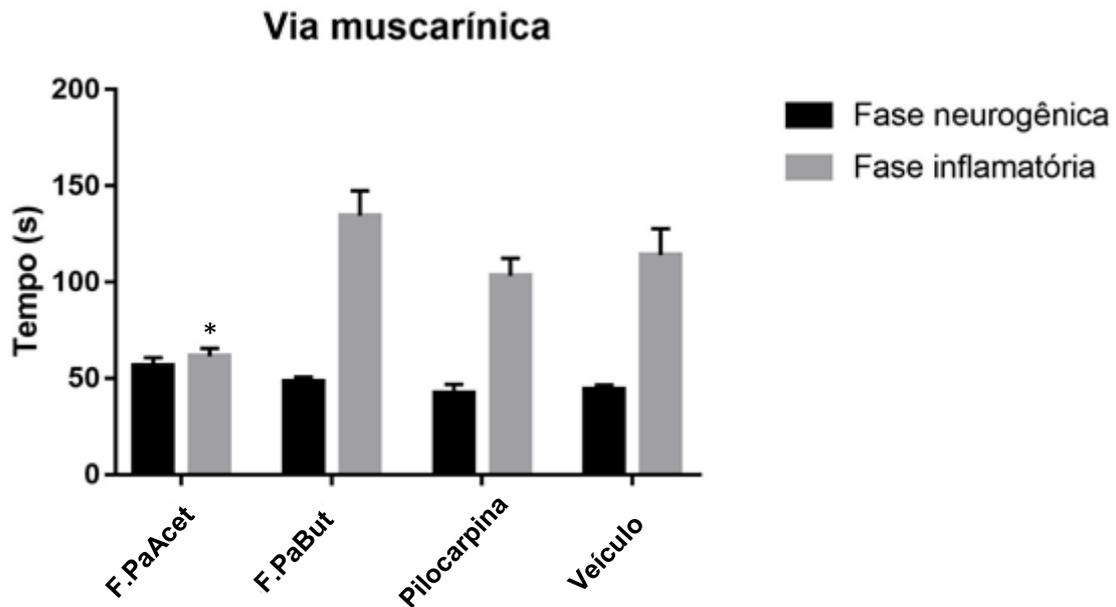


Figura 7. Efeito do pré-tratamento com atropina (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nociceção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p<0,05 versus F.PaBut, controle positivo e controle negativo na fase inflamatória.

A fase 2 (inflamatória) do grupo F.PaAcet apresentou uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) em relação aos demais grupos, apresentando um tempo de lambertura menor da pata lesionada. Logo, sugere-se que a fração não atua por esta via nas doses e concentrações testadas, visto que não houve interferência no tempo de lambertura da pata lesionada (Figura 7).

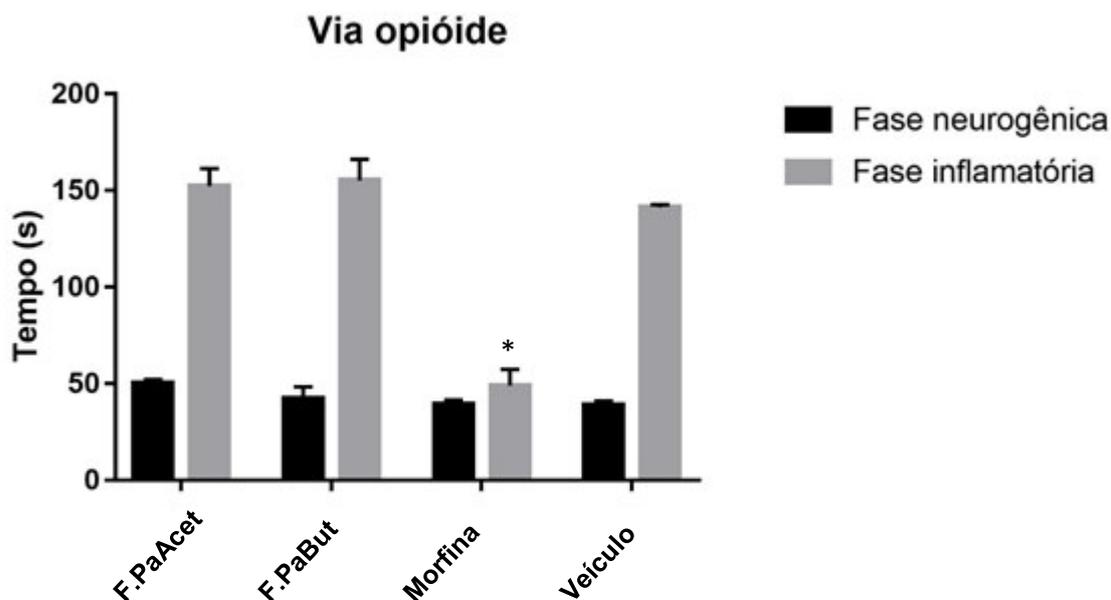


Figura 8. Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo das frações acetato (F.PaAcet) e butanólica (F.PaBut) da *Persea americana* Mill. no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA. *p<0,0001 versus F.PaAcet, F.PaBut e controle negativo na fase inflamatória.

A fase 2 (inflamatória) do grupo morfina (agonista da via) apresentou uma diferença estatisticamente significativa (*p<0,0001) em relação aos demais grupos, apresentando um tempo de lambertura da pata, indicando que a morfina foi capaz de reverter o bloqueio do antagonista da via, naloxona (Figura 8).

Como não houve diminuição no tempo de lambertura da pata lesionada nos demais grupos sob ação do antagonista da via, sugere-se que as frações possam atuar na fase inflamatória através dessa via, nas doses e concentrações testadas (Figura 8).

3.2. Teste de edema de pata induzida por carragenina

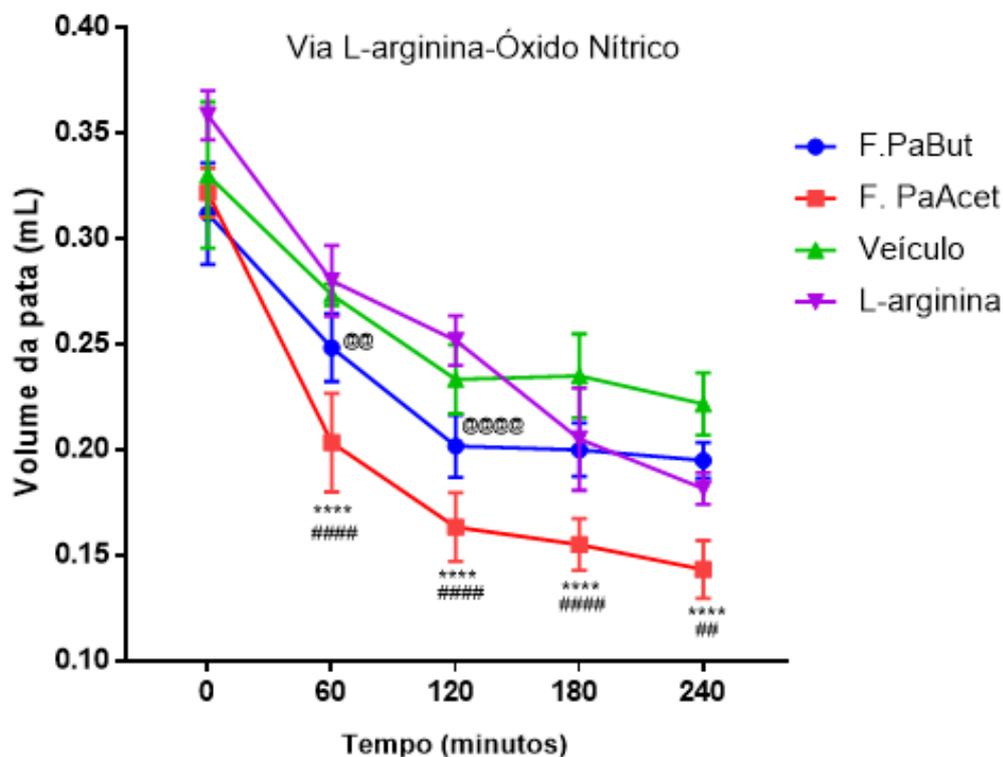


Figura 9. Efeito das F.PaBut e F.PaAcet (50 mg/Kg,v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e Veículo (NaCl 0,9%,v.o.) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** p<0,0001 comparando F.PaAcet versus grupo veículo; ##### p<0,0001 e ## p=0,0011 comparando F.PaAcet versus grupo L-arginina; @@ p=0,0097 e @@@@ p<0,0001 comparando F.PaBut versus grupo L-arginina.

Na via L-arginina do teste edema de pata induzido por carragenina, o tratamento realizado com a F.PaBut na dose de 50mg/kg reduziu significativamente o volume da pata lesionada com 60 minutos ($p=0,0097$) e 120 minutos ($p<0,0001$) após o início do teste, quando comparado ao grupo controle positivo L-arginina. A partir dos 120 minutos, não foi observado resultados estatisticamente significantes quanto à redução do edema (Figura 9).

Já a F.PaAcet, na dose de 50mg/kg reduziu significativamente o volume da pata lesionada a partir do 60 minutos do início do teste, até o final do teste, com 240 minutos, quando comparado ao grupo controle positivo L-arginina ($p=0,0097$) e ao grupo controle negativo veículo ($p<0,0001$) (Figura 9).

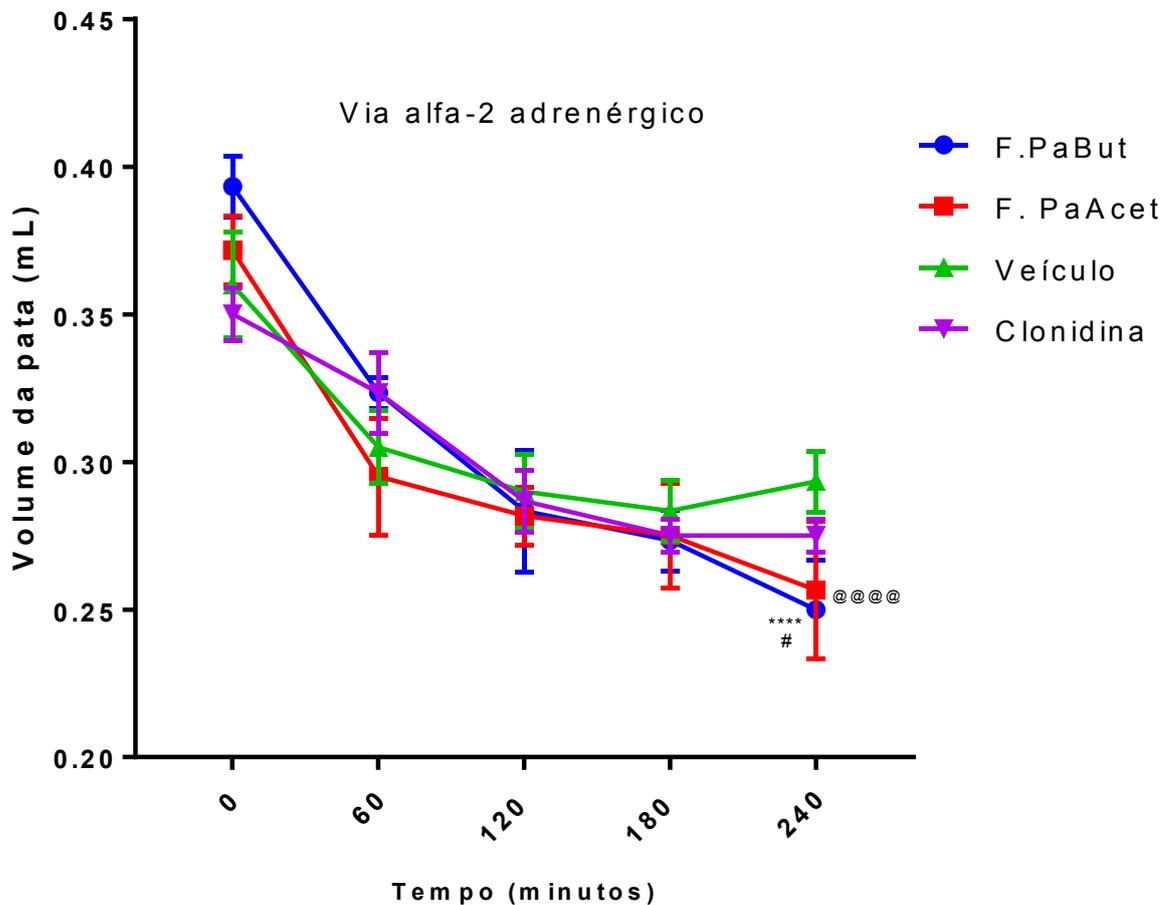


Figura 10. Efeito das F.PaBut e F.PaAcet (50 mg/Kg,v.o.), Clonidina (0,1mg/Kg,i.p.) e Veículo (NaCl 0,9%,v.o.) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste two-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** p<0,0001 comparando F.PaBut versus grupo veículo; # p=0,0203 comparando F.PaBut versus grupo clonidina; @@@@ p<0,0001 comparando F.PaAcet versus grupo veículo.

Na via alfa-2 adrenérgico do teste edema de pata induzido por carragenina, o tratamento realizado com a F.PaBut na dose de 50mg/kg reduziu significativamente o volume da pata lesionada ao final do teste, com 240 minutos, quando comparado ao grupo controle positivo clonidina (p=0,0203) e ao grupo controle negativo veículo (p<0,0001) (Figura 10).

A F.PaAcet, na dose de 50mg/kg também reduziu significativamente o volume da pata lesionada ao final do teste, com 240 minutos, quando comparado ao grupo controle negativo veículo (p<0,0001) (Figura 10).

4. DISCUSSÃO

O teste de formalina é composto por duas fases, uma neurogênica (primeiros 5 minutos) e outra inflamatória (15 à 30 minutos). A fase neurogênica está associada principalmente à ativação das fibras C, devido ao estímulo da formalina. Enquanto que a segunda fase está associada à dor inflamatória, ocasionada pela liberação de histaminas, bradicinina, serotonina e prostaglandinas (CARVALHO & LEMONICA, 1997).

Ao avaliar a fase neurogênica dos grupos F.PaBut e F.PaAcet em todas as quatro vias estudadas, não foi possível identificar resultados estatisticamente significantes, inferindo que suas ações não são mediadas pela inibição da ativação direta dos nociceptores locais.

Já a fase inflamatória do grupo F.PaBut no estudo das vias L-arginina-óxido nítrico e alfa-2-adrenérgico, apresentou um tempo de lambertura da pata estatisticamente significativa menor que os grupos F.PaAcet e veículo, semelhante aos agonistas das vias, L-arginina e Clonidina, respectivamente. Diante disso, pôde-se evidenciar que a fração butanólica tenha sua ação antinociceptiva e anti-inflamatória associada principalmente à inibição da liberação de histaminas, bradicinina, serotonina e prostaglandinas, visto que mesmo sob efeito dos antagonistas das vias, foi possível constatar resultados significantes.

Ao avaliar a participação da via opioide através do teste de formalina, o único resultado com relevância estatística encontrado foi o grupo controle positivo, morfina, que apresentou um tempo de lambertura menor na pata lesionada, na fase inflamatória do teste, quando comparado aos demais grupos em estudo, indicando assim, sua eficácia na reversão do bloqueio da via com naloxona. Como os demais grupos não apresentaram resultados com significância, sugere-se que sua atividade possa estar relacionada à via opióide, considerando que não houve diminuição no tempo de lambertura quando sob presença do antagonista da via, a naloxona.

No mesmo teste, mas avaliando a participação do sistema muscarínico, o resultado com significância encontrado foi do grupo F.PaAcet, que apresentou uma diminuição no tempo de lambertura na fase inflamatória do teste, quando

comparado aos demais grupos em estudo, sugerindo assim, que a fração acetato não atua por esta via nas doses e concentrações testadas, visto que não houve interferência no tempo de lambertura da pata lesionada quando estava sob efeito do antagonista da via. Além da associação do seu efeito com a inibição da liberação dos mediadores inflamatórios (histaminas, bradicinina, serotonina e prostaglandinas). Embora tenha sido evidenciado por Umana e colaboradores (2013) que o bloqueio do receptor muscarínico impediu a antinocicepção induzida pela fisostigmina, indicando que há a possibilidade dos receptores muscarínicos estarem envolvidos na modulação da dor.

Um estudo realizado por Adedayo e colaboradores (2019), ao avaliar o extrato metanólico de *Cola nitida* nas concentrações de 50mg/kg, 100mg/kg e 200mg/kg, evidenciou que houve uma redução significativa do tempo de lambertura nas duas fases do teste de formalina, neurogênica e inflamatória. Entretanto, o efeito do extrato foi mais efetivo na fase tardia do experimento, assim como no presente estudo, que foi observado respostas estatisticamente significantes apenas na fase inflamatória. A *Cola nitida* possui compostos semelhantes aos da *Persea americana* Mill, como fenóis, taninos e flavonoides (Dewole et al.,2013).

O teste de edema de pata induzido por carragenina é um teste bifásico, onde no primeiro momento (primeira hora do teste), o processo inflamatório é mediado por histaminas, serotonina e bradicinina. Já a segunda fase (a partir da 3ª hora do teste até 5ª hora), é mediada por prostaglandinas (ALVES, 2010).

Ao avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico, o grupo F.PaBut na dose de 50mg/kg reduziu significativamente o edema da pata nos 60 minutos e 120 minutos, quando comparado ao grupo controle positivo L-arginina após o início do teste, sugerindo então, que sua ação está associada à inibição da liberação de histaminas, serotonina e bradicinina. Após 120 minutos, não foi observado diminuição do edema de pata, apontando que sua atividade não está associada a inibição de prostaglandinas. Entretanto, o grupo F.PaAcet na dose de 50mg/kg reduziu significativamente o edema de pata a partir dos 60 minutos do teste até a última hora, 240 minutos, quando comparado ao grupo controle

positivo L-arginina e ao grupo controle negativo veículo. Dessa forma, sua atividade está associada à inibição da liberação de prostaglandinas.

O NO é formado a partir da L-arginina, que sofre uma reação catalisada por uma família de enzimas, a óxido nítrico sintases (NOS), que converte L-arginina em L-citulina e NO (BRUNINI et al.,2006). O L-NAME é análogo da L-arginina, inibindo assim, a síntese de NO (FLORA FILHO & ZILBERSTEIN, 2000). Seu envolvimento na resposta inflamatória pode estar associado com o aumento da liberação de prostaglandinas pró-inflamatórias (CERQUEIRA; YOSHIDA, 2002).

Sugere-se que a modulação da liberação de NO está envolvida na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da F.PaBut da *Persea americana* Mill. e que a inibição da síntese de NO possivelmente seja um dos mecanismos moleculares envolvidos na ação da fração, visto que, sob efeito do antagonista da via, L-NAME, houve uma diminuição no tempo de lambertura da pata lesionada na fase inflamatória do teste de formalina e do edema da pata após indução com carregena. Esse resultado corrobora com a literatura, onde estudo realizado por Saragusti et al. (2012) evidenciou participação do NO na segunda fase do teste de nocicepção induzida por formalina, potencializando efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato em estudo após inibição da síntese de NO.

Já na avaliação da participação da via α_2 -adrenérgica, tanto o grupo F.PaBut, como o F.PaAcet, na dose de 50mg/kg, apresentaram uma redução no edema de pata estatisticamente significativa apenas na hora final do teste (240 minutos), quando comparado ao grupo controle positivo clonidina e ao grupo controle negativo veículo, indicando que sua atividade está associada à inibição da liberação de prostaglandinas.

A liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos é bloqueada pela ativação dos receptores α_2 -adrenérgicos a partir da administração da clonidina. A noradrenalina pode agir em neurônios pós-ganglionares do simpático, provocando o estímulo da liberação de prostaglandinas hiperalgésicas (BRAZ; CASTIGLIA, 2000). Dessa forma, ao observar que semelhante ao grupo clonidina, a F.PaBut apresentou uma redução no tempo de lambertura da pata

lesionada na fase inflamatória do teste de formalina e do edema da pata após indução com carragenina, sugere-se que esta atue de forma semelhante na modulação da liberação de prostaglandinas.

5. CONCLUSÃO

O presente estudo propõe que as frações butanólica e acetato de etila da *Persea americana* Mill. apresentem ação anti-inflamatória significativa nas doses e concentrações testadas, sugerindo que as frações tenham suas atividades associadas a modulação da liberação de NO, assim como a modulação da liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos na fase inflamatória do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata induzido por carragenina, associado a inibição da liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, indicando uma potencial utilização da espécie vegetal na elaboração de fármacos para tratamento de doenças inflamatórias. Entretanto, ainda se faz necessário estudos complementares, para evidenciar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Persea americana* Mill.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os objetivos do presente estudo foram atingidos durante o desenvolvimento do mestrado, pretendendo-se submeter o resultado desse estudo à publicação em revista acadêmica. Foi proposto que as frações butanólica e acetato de etila da *Persea americana* Mill. apresentem ação anti-inflamatória significativa nas doses e concentrações testadas, sugerindo que as frações tenham suas atividades associadas a modulação da liberação de NO, assim como a modulação da liberação de noradrenalina dos terminais simpáticos na fase inflamatória do teste de nocicepção induzida por formalina e edema de pata induzido por carragenina, associado a inibição da liberação de mediadores inflamatórios, como histaminas, serotonina, bradicinina e prostaglandinas, indicando uma potencial utilização da espécie vegetal na elaboração de fármacos para tratamento de doenças inflamatórias. Entretanto, ainda se faz necessário estudos complementares, como identificação dos compostos ativos das frações, docagem molecular, entre outros, para evidenciar os mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Persea americana* Mill.

REFERÊNCIAS

- ABUBAKAR, M. G., ADAMU, L., 2013 Antinociceptive effects of avocado leaf extracts (*Persea americana*) on rats. *Toxicology Letters*. S89
- ADEBOYE, J.O.; FAJONYOMIA M.O.; MAKINDEB, J.M.; TAIWOB, O.B. A preliminary study on the hypotensive activity of *Persea americana* leaf extracts in anaesthetized normotensive rats. **Fitoterapia**. 1999; 70: 15–20
- ADEDAYO, Lawrence Dayo et al. Methanol extract of *Cola nitida* ameliorates inflammation and nociception in experimental animals. *Neurobiology of pain*, [S. l.], p. 1-7, 21 jan. 2019
- ADEYEMI O.O., OKPO S.O., OGUNTI O.O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae). **Fitoterapia**. 2002; 73(5): 475-380
- AGRIANUAL. **Anuário da agricultura brasileira**. São Paulo: FNP Consultoria, 2014. p. 111-115
- ALONSO, J. Tratado de fitofármacos y nutracéuticos. Ed. Corpus, p. 76-79, 2004
- ALVES, José Edgard de Oliveira *et al.* Mecanismos fisiopatológicos da nocicepção e bases da analgesia perioperatória em pequenos animais. **Acta Biomedica Brasiliensia**, [S. l.], p. 56-68, 2017
- ALVES, Suerda Bezerra. **Estudo Experimental da Cinética de Secagem do Abacate (*Persea americana* Mill.)**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia Mecânica) - Universidade Federal da Paraíba, [S. l.], 2010
- ATTAL, N. *et al.* EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **Eur J Neurol**, [S. l.], p. 1113-e88, 16 ago. 2010
- BAGATINI, Airton; GOMES, Cláudio Roberto; MASELLA, Marcelo Zanettini; REZER, Gabrielle. Dexmedetomidine: Pharmacology and Clinical Application. **Rev Bras Anesthesiol**, [S. l.], p. 606 - 617, out. 2002
- BARREIRO, Eliezer J.; BOLZAN, Vanderlan da Silva. Physicochemical Parameters, Phytochemical Composition and Antioxidant Activity of the Algarvian Avocado (*Persea americana* Mill.). **Journal of Agricultural Science**, [S. l.], p. 100-109, 15 nov. 2013
- BARREIRO, Eliezer J. *et al.* Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quím. Nova**, [S. l.], p. 1678-7064, 2009

BARROSO GM, GUIMARÃES EF, ICHASO CLF. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. v. 1, 309 p. Viçosa: UFV, 2002.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira**. 5. ed. Brasília, DF: ANVISA, 2010.

BRAZ, Jose Reinaldo Cerqueira; CASTIGLIA, Yara Marcondes Machado. **Temas de Anestesiologia**. [S. l.]: Unesp, 2000

BONFIM, B.F. **Ação de *Persea americana* Mill. em modelo experimental de osteoartrite em ratos**. 2019. 75f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

BRONDANI, J.T.; NATALINI, C.C.; RAISER, A.G.; MAZZANTI, A.; PRATI, L. Analgesia epidural com clonidina ou romifidina em cães submetidos à cirurgia coxofemoral. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**, [S. l.], p. 175-182, 2004.

BRUNINI, Tatiana M.C.; PERIM, Nicole; COSTA, Érica; RIBEIRO, Antônio C. Mendes. O papel da via L-arginina-óxido nítrico em doenças pulmonares. **Pulmão**, [s. l.], p. 184-190, 15 set. 2006.

CAIRES, Laila Pires; CLARK, Rosana Maria de Oliveira. Agonistas alfa-2 pela via epidural na analgesia de cães e gatos – revisão de literatura. **Veterinária e Zootecnia**, [S. l.], p. 359-369, set. 2014.

CAMPOS JS. **Cultura racional do abacateiro**. SP, ICONE, 1985. (Coleção Brasil Agrícola). p. 11-136

CARVALHO, Wilson Andrade; LEMÔNICA, Lino. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Rev Bras Anesthesiol**, [S. l.], p. 137 - 158, 3 nov. 1997.

CERQUEIRA, Nereide Freire; YOSHIDA, Winston Bonetti. Óxido nítrico: revisão. **Acta Cir. Bras**, [S. l.], p. 1678-2674, 2002.

CURY, Yara; PICOLO, Gisele; GUTIERREZ, Vanessa Pacciari; FERREIRA, Sergio Henrique. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, [S. l.], p. 243-254, 30 out. 2011.

DALE, R., STACY, B. Multimodal Treatment of Chronic Pain. **Medical Clinics of North America**. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712515001509>> Acesso em: 28 de outubro de 2017.

DE CASTRO, Rodrigo José Alencar; LEAL, Plínio Cunha; SAKATA, Rioko Kimiko. Tratamento da dor em queimados. **Rev Bras Anesthesiol**, [S. l.], p. 149-158, 2013.

DEWOLE, E.A. et al. Proximate and Phytochemical of Cola nitida and Cola acuminata. **Pak J Biol Sci**, [S. l.], p. 1593-1596, 15 nov. 2013.

DING, H.; CHIN, Y.; KINGHORN, A.D.; AMBROSIO, S.M.D. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. **Semin Cancer Biol**. 2007; 17: 386-394.

EZEJIOFO, A.N.; OKORIE, A.; ORISAKWE, O.E. Hypoglycaemic and tissue-protective effects of the aqueous extract of *Persea americana* seeds on alloxan-induced albino rats. **Malays J Med Sci**, [S. l.], p. 31-39, out. 2013

FERRELL BR, WISDOM C, RHINER M, ALETTO J. Pain management as a quality of care outcome. **Journal of Nursing Quality Assurance**. v.5, n.2, p.50-58, 1991.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, [s. l.], p. 265-271, 2000

FRANCA, LG. **Avaliação Pré-clínica de *Persea americana* Miller: caracterização química, toxicidade e potencial farmacológico na modulação da dor neuropática em ratos**. 2018. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís.

FREIRE M.O; VAN DYKE T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol**. v.63, n.1, p.149-164, 2013

GUIRIMAND F, LE BARS D. Physiologie de lanociception. **Ann. Fr. Anesth. Réanim**. v. 15, p. 1048-1079, 1996

GOODMAN & GILMAN. **Manual de Farmacologia e Terapêutica**. [S. l.]: AMGH Editora Ltda, 2010.

GOOLAN, David E. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da Farmacoterapia**. 2. ed. [S. l.]: Guanabara Koogan, 2009.

Hernandez, A.I.G. et al., 2014. Validación Preclínica De Actividad Analgésica Periférica Y Central De La Decocción De Hojas Frescas De *Persea americana* Mill. (Aguacate) Y Musa X Paradisiaca L. (Plátano). *Revista Cubana De Plantas Medicinales*. 19(1),225-234.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Produção Agrícola Municipal**. Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2016_v43_br.pdf> Acesso em: 11 de março de 2019

JIMENEZ-ARELLANES, J. et al. Antiprotozoal and antimycobacterial activities of *Persea americana* seeds. **BMC Complem and Alt Med**. 2013; 13(109): 1-5.

KOLLER OC. Abacate: produção de mudas, instalação e manejo de pomares, colheita e pós-colheita. Porto Alegre: **Cinco Continentes**, 145 p. 2002.

LEITE, J. J. G. *et al.* Chemical composition, toxicity and larvicidal and antifungal activities of *Persea americana* (avocado) seed extracts. **R Soc Bra de Med Trop**, [S. l.], p. 110–113, 2009.

LIMA NFM. **Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da *Persea americana***. 2018. 72f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, São Luis.

LIMA, Rafael Rodrigues; COSTA, Ana Maria Rabelo; DE SOUZA, Renata Duarte; LEAL, Wallace Gomes. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, [s. l.], v. 21, p. 29-34, 1 jun. 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544p

LU, Q.; ARTEGA, J.R.; ZHAND, Q.; HUERTA, S.; GO, V.L.W.; HEBER, D. Inhibition of prostate cancer cell growth by an avocado extract: role of lipid-soluble bioactive substances. **J. Nutr. Biochem**. 2005; 16: 23-30.

MASEKO, B.R.; NKAMBULE, C.; BOTHA, M.B. Synthesis of authentic organic standards of antibacterial compounds isolated from avocados. Tshwane University of Technology, Department of Chemistry and Physics Faculty of Natural Sciences. 2006; 1-4.

MIRANDA, Elaine Rossy Delgado Silva. **Análise dos efeitos terapêuticos da *Cannabis sativa* L., no tratamento da dor neuropática**. 2016. Monografia (Bacharel em Biomedicina) - Universidade do Extremo Sul Catarinense – UNESC, [S. l.], 2016

MIRANDA, Claudia Jeane Claudino de Pontes. **Efeito do tratamento com PNU-282987, agonista do receptor colinérgico nicotínico $\alpha 7$, na resposta inflamatória e de remodelamento brônquico em modelo experimental de asma**. 2016. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) - Faculdade de Medicina - Universidade de São Paulo, [S. l.], 2016.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. PORTARIA Nº 1083, DE 02. DE OUTUBRO DE 2012. **Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica**, [S. l.], p. 1-29, 2012.

MERRER, J et al. Reward processing by the opioid system in the Brain. **Physiological Reviews**, v.89, p. 1379-1412, 2009

OJEWOLE, J.A.; AMABEOKU, G.J. Anticonvulsant effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) leaf aqueous extract in mice. **Phytother Res**, [S. l.], p. 696-700., ago. 2006

PEIXOTO RF, SANTOS DHF, MENEZES DPB, ARAÚJO DD, PEIXOTO DF, DA SILVA JSP. Controle da Dor Pós-Operatória em Cirurgia Oral: Revisão de Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**. 2011;15(4):465-47.

POPENOE W. 1924. The Avocado. IN: **Manual of Tropical and Subtropical Fruits**. The MacMillan Company. New York, 9-78.

PORTNOI, AG. **A psicologia da dor**. São Paulo: Ed. Guanabara Koogan, 2014. p. 272.

REGO, T.J.A., 1995. Fitogeografia das Plantas Medicinais no Maranhão. 2a. edição Editora UFMA, São Luís, Brasil, 150p.

ROSSETTO, Edilaine G. *et al.* Epidemiologia da dor em crianças, adultos e idosos. **Arq Bras Neurocir**, [S. l.], p. 213-224, 1999.

ROMERO, Francisco Botella; MONTAÑEZ, Elisa Martín; GUTIÉRREZ, Eugenio Jiménez; MOLINA, José Pavía. Caracterización de receptores muscarínicos en células indiferenciadas tiroideas de ratas Fisher. **Endocrinol Nutr**, [S. l.], p. 106-11, 2009.

ROCHA APC, KRAYCHETE DC, LEMONICA L, CARVALHO LR, BARROS GAM, GARCIA JBS, SAKATA RK. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. (2007). **Revista Brasileira Anestesiologia**. Artigo de revisão 2007; 57: 1: 94-105

RODRIGUEZ-CARPENA J.G., *et al.* Avocado (*Persea americana* Mill.) phenolics, in vitro antioxidant and antimicrobial activities, and inhibition of lipid and protein oxidation in porcine patties. **J of Agric and Food Chem**. 2011; 59(10): 5625–5635.

SALEHI, Bahare *et al.* Avocado–Soybean Unsaponifiables: A Panoply of Potentialities to Be Exploited. **Biomolecules**, [S. l.], p. 1-20, 13 jan. 2020.

SARAGUSTI, A.C. *et al.* Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the antinociceptive caused by fruits of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. **Journal Ethnopharmacology**. v. 140, p. 117-122, 2012

SCHOELLER, Soraia Dornelles. **Abordagem multiprofissional em lesão medular: saúde, direito e tecnologia**. Florianópolis: IFSC, 2016. 304 p

STEIN C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **Eur J Pharmacol**. v.716, n.15, p.179-187, 2013.

TANGO JS, TURATTI JM. Óleo de abacate. In: **ABACATE – cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. Campinas: ITAL, 1992. p. 156-192

TESKE, M.; TRENTINI, A.M.M. Herbarium compendio de fitoterapia. 3.ed. Curitiba: **Herbarium Laboratorio Botanico**, 1997. 317p

TEIXEIRA CG. CULTURA IN. **Abacate: Cultura, matéria-prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. Ed Campinas: Instituto Campineiro de Ensino Agrícola, Cap. 1, p. 1-54. (Frutas Tropicais), 1995

UMANA, Iboro C.; DANIELE, Claire A.; MCGEHEE, Daniel S. Neuronal nicotinic receptors as analgesic targets: It's a winding road. **Biochem Pharmacol**, [S. l.], p. 1208–1214, 15 out. 2013

VALADÃO, Carlos Augusto Araújo; DUQUE, Juan Carlos; FARIAS, Anderson. Administração epidural de opioides em cães. **Ciência Rural**, [S. l.], p. 347-355, 2002.

VITOR, Aline Oliveira *et al.* Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **R. Eletr. de Com. Inf. Inov. Saúde**, [S. l.], p. 87-96, 2008.

VIEIRA, MEB. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **J Pain Symptom Manage**, v. 44, n.2, p.239-241, 2012

V SIMPÓSIO DE MEDICINA VETERINÁRIA DO CENTRO UNIVERSITÁRIO CESMAC, 2015, Marechal Deodoro - Alagoas. **A influência dos agonistas alfa-2-adrenérgicos no bloqueio atrioventricular em equinos [...]**. [S. l.: s. n.], 2015.

XVII ENCONTRO LATINO AMERICANO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2013, São José dos Campos. **Mecanismos da inflamação: análise dos processos fisiopatológicos [...]**. [S. l.: s. n.], 2013.

ANEXO A: Certificado de Autorização CEUA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-CEUA
CIAEP: 01.0341.2014



Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO ANTINOCICEPTIVO DAS FRAÇÕES DE PERSEA AMERICANA MILL**” registrada com o nº **23115.015096/2017-75**, sob a responsabilidade de **MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES**, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	15/01/2018 à 30/12/2020
Espécie/linhagem/raça	Camundongos <i>Swiss</i>
Nº de animais	135
Peso/Idade	20-30g/30 a 50 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFMA

Prof. Dr. Rafael Cardoso Carvalho
Presidente da Comissão de Ética no uso de Animais – CEUA/UFMA

ANEXO B: Certificado de tombo de exsicata

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
Fundação Instituída nos termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão.



DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA - CCBS
HERBÁRIO DO MARANHÃO - MAR

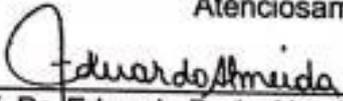
São Luís, 10 de Outubro de 2018

CONFIRMAÇÃO DE IDENTIFICAÇÃO

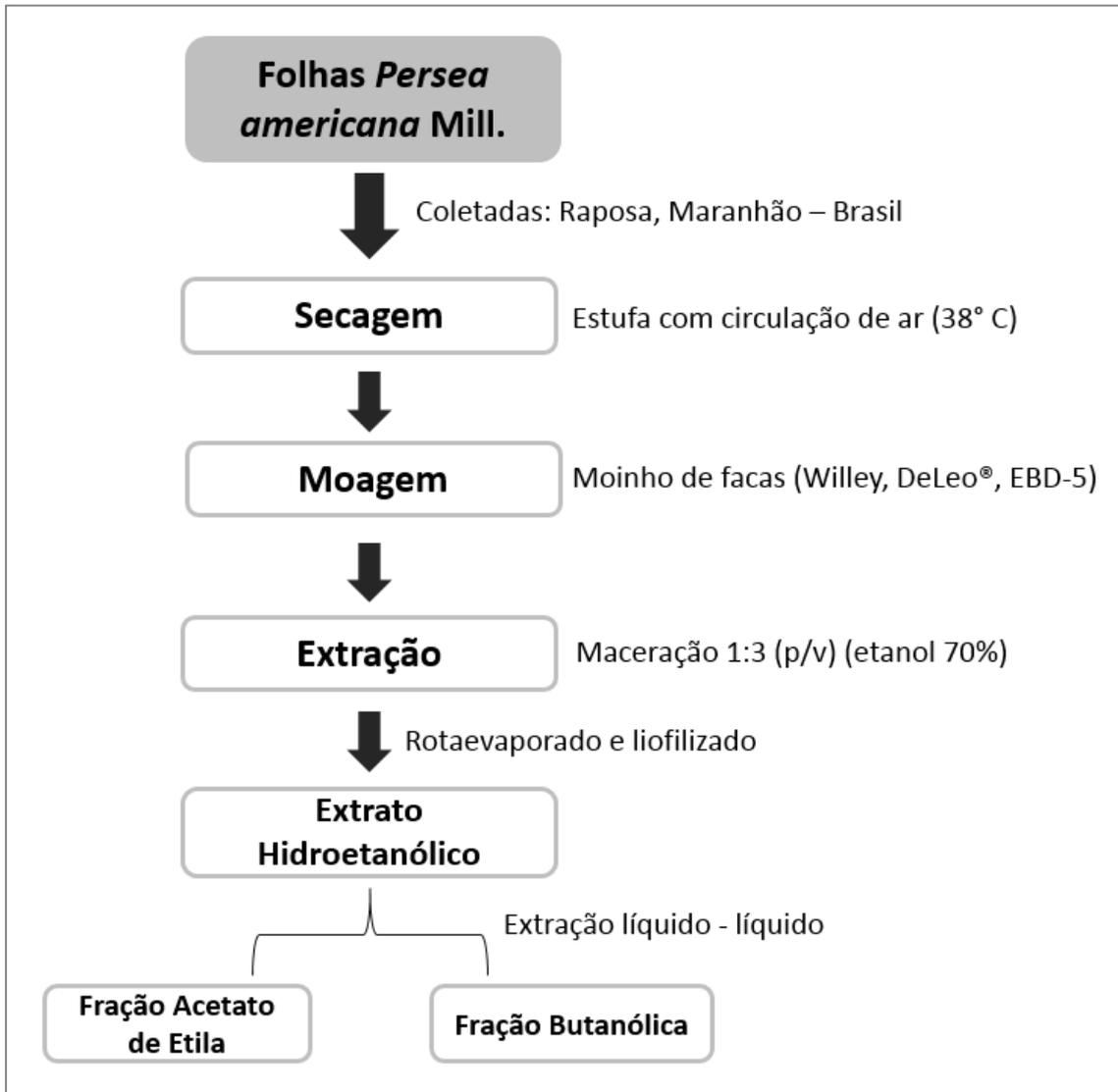
Segue abaixo a confirmação da identificação solicitada. Desde já agradecemos o envio do material e informamos que o mesmo estará devidamente catalogado no acervo do Herbário MAR.

Nº tombo MAR	Coletor (número)	Família	Espécie
10.960	B. F. Bonfim (01)	Lauraceae	<i>Persea americana</i> Mill.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.
Curador do Herbário MAR

APÊNDICE A: Esquema ilustrativo do processamento da espécie vegetal



APÊNDICE B: Esquema do protocolo experimental Teste de Formalina

Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

(Total = 96 animais) **

Método de Nocicepção Induzida por Formalina *

Avaliação Analgésica

Envolvimento do sistema opioide

Pré-tratados com naloxona
5mg/kg i.p.

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com morfina 5 mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico

Pré-tratados com L-NAME (50
mg/kg, i.p.

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com L-arginina 600mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

Envolvimento do sistema α 2- adrenergico

Pré-tratados com ioimbina
0,15mg/kg i.p.

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com pilocarpina 3 mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

Envolvimento do sistema muscarínico

Pré-tratados com atropina
5mg/kg i.p.

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com clonidina 0,1 mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

*Avaliados clinicamente após a indução de nocicepção por formalina, sendo eutanasiados após a última avaliação.

**Cada grupo com um n=6 animais.

APÊNDICE C: Esquema do protocolo experimental Teste Edema de Pata

Camundongos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss

(Total = 48 animais) **

Método de Edema de Pata induzido por carragenina *

Avaliação Anti-inflamatória

Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico

Pré-tratados com L-NAME (50 mg/kg, i.p.)

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com L-arginina 600mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

Envolvimento do sistema α 2-adrenergico

Pré-tratados com ioimbina 0,15mg/kg i.p

- ⇒ Tratados com fração acetato de etila de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo A)
- ⇒ Tratados com fração butanólica de *Persea americana* Mill. 50mg/kg (Grupo B)
- ⇒ Tratados com clonidina 0,1 mg/kg (Grupo C)
- ⇒ Tratados com veículo 10ml/Kg (Grupo D)

*Avaliados clinicamente após a indução de carragenina, sendo eutanasiados após a última avaliação.

**Cada grupo com um n=6 animais.