

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de
Annona squamosa e da sua substância isolada, palmatina**

CAREN NAOMI AGUERO ITO

**Dourados - MS
2022**

CAREN NAOMI AGUERO ITO

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Annona squamosa* e da sua substância isolada, palmatina

Área do CNPq: Etnofarmacologia (2.10.06.00-8)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof^a. Dr^a. Candida Aparecida Leite Kassuya
Co-orientador: Prof^a. Dr^a. Arielle Cristina Arena

Dourados - MS

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

I893a Ito, Caren Naomi Agüero.
Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Annona squamosa* e da sua substância isolada, palmatina. / Caren Naomi Agüero Ito. – Dourados, MS: UFGD, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Candida Aparecida Leite Kassuya.
Coorientadora: Profa. Dra. Arielle Cristina Arena.
Mestrado (Faculdade de Ciências da Saúde) – Universidade Federal da Grande Dourados.

1. Alcaloides. 2. Plantas medicinais. 3. Anti-hiperalgésico. 4. Inflamação. 5. Artrite I. Título.

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central – UFGD.

©Todos os direitos reservados. Permitido a publicação parcial desde que citada a fonte.



UFPGD

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA POR, CAREN NAOMI AGUERO ITO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Aos oito dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte e dois, às 14 horas, em sessão pública, realizou-se por videoconferência a defesa de dissertação de Mestrado intitulada "**Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Ammona squamosa* e da sua substância isolada, palmatina**" apresentada pela aluna **Caren Naomi Aguero Ito**, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos membros: Prof.ª Dr.ª Cândida Aparecida Leite Kassuya - PPGCS/UFPGD (presidente), Dr. Luis Fernando Benitez Macorini/UNIGRAN e Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFPGD. Iniciados os trabalhos, a presidência deu a conhecer à candidata e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da dissertação. Após a candidata ter apresentado a sua explanação, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições. Terminada a Defesa, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou aos trabalhos de julgamento, tendo sido a candidata considerada APROVADA, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. **A presidente da banca abaixo-assinado atesta que os doutores Luis Fernando Benitez Macorini e Marcio Eduardo de Barros participaram de forma remota desta defesa de dissertação, conforme o § 3º do Art. 1º da Portaria RTR/UFPGD n. 200, de 16/03/2020 e a Instrução Normativa PROPP/UFPGD Nº 1, de 17/03/2020, considerando a candidata APROVADA, conforme declarações anexas.** Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pela presidente da Comissão Examinadora.

Dourados, 08 de fevereiro de 2022.

Dr.ª Cândida Aparecida Leite Kassuya - PPGCS/UFPGD
Dr. Luis Fernando Benitez Macorini/UNIGRAN (participação remota)
Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFPGD (participação remota)

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFPGD.

Pró-Reitoria de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa
Assinatura e Carimbo

AGRADECIMENTOS

O desenvolvimento desta dissertação foi realizado com a colaboração de muitas pessoas, das quais gostaria de demonstrar o meu agradecimento.

A minha orientadora, Profa. Dra. Cândida Aparecida Leite Kassuya, pela orientação, paciência e pela oportunidade de aprender novas informações, práticas e teóricas, que contribuíram na minha formação acadêmica, científica e pessoal. E, também, a minha coorientadora, professora Dra. Arielle Cristina Arena, que me ajudou durante o mestrado.

Ao professor do Departamento de Biologia Vegetal Marcos José Salvador da UNICAMP, pela preparação e obtenção do extrato e pela análise fitoquímica e isolamento da palmatina. Ao professor Saulo Euclides Silva-Filho da UFMS, pelo auxílio no teste da viabilidade leucocitária pelo teste de MTT.

Aos meus pais, Akira e Perla, por terem me dado as condições materiais e morais, que permitiram o meu desenvolvimento pessoal e profissional, pelo incentivo a cada momento e por acreditarem no meu potencial. Agradeço, também, a minha irmã, Laís, pelo apoio e incentivo durante esta etapa. Muito obrigada por tudo!!

Aos meus colegas de laboratório, Elisângela, Camila, Rafael e Thiago, pela ajuda nos experimentos, pela troca de conhecimento, que me auxiliaram no meu desenvolvimento pessoal e científico. E aos integrantes do nosso grupo de pesquisa, laboratório de dor e inflamação, que ajudaram, direta ou indiretamente, no desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo apoio financeiro e concessão da bolsa de estudos.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Estrutura química da Palmatina

31

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	Ácido araquidônico
AINES	Anti-inflamatórios não-esteroides
AMPK	AMP-activated protein kinase (Proteína quinase ativada por AMP)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASBT	Apical sodium-dependent bile acid transporter (Transportador apical de sal biliar dependente de sódio)
CB2	Cannabinoid receptor 2 (Receptor canabinoide 2)
CFA	Complete Freund adjuvant (Adjuvante completo de Freund)
c-FLIP	c-FLICE inhibitory protein (Proteína inibidora semelhante a c-FLICE)
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX-1	Ciclooxigenase-1
COX-2	Ciclooxigenase-2
COXIBEs	Inibidores seletivos da ciclooxigenase-2
CYP7A1	Cholesterol 7 α -hydroxylase (Colesterol 7 α -hidroxilase)
DAMPs	Damage-associated molecular pattern (Padrões moleculares associados ao dano)
DENV-2	Dengue virus type 2 (Vírus da dengue tipo 2)
DHA	Docosahexaenoic acid (Ácido docosahexaenóico)
DMBA	7,12-dimethylbenz(a)anthracene (7,12-dimetilbenzantraceno)
EMAS	Extrato metanólico de <i>Annona squamosa</i>
EPA	Eicosapentaenoic acid (Ácido eicosapentaenoico)
ERK1/2	Extracellular signal-regulated protein kinases 1 and 2 (Proteínas cinases 1 e 2 reguladas por sinal extracelular)
GCs	Glicocorticoides
GRAM +	Bactéria Gram positiva
GRAM-	Bactéria Gram negativa
HMG-CoA	3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A (3-hidroxi-3-metilglutaril-Coenzima A)

iNos	Inducible nitric oxide synthase (Óxido nítrico sintase)
IL-1 β	Interleukin 1 β (Interleucina-1 β)
IL-6	Interleukin- 6 (Interleucina-6)
IL-10	Interleukin- 10 (Interleucina-10)
IRFs	Interferon-regulatory factors (Fatores reguladores de interferon)
Jak	Janus kinase (Janus quinase)
JEV	Japanese encephalitis virus (Vírus da encefalite japonesa)
LPS	Lipopolysaccharide (Lipopolissacarídeo)
MMP	Matrix metalloproteinase (Metaloproteinase de matriz)
MPO	Myeloperoxidase (Mieloperoxidase)
MT	Mato Grosso
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio)
NE	Norepinephrine (Norepinefrina)
NFATs	Nuclear factor of activated T cells (Fator nuclear de células T ativadas)
NF- κ B	Nuclear factor-kappaB (Fator nuclear kappa B)
NLRs	NOD-like receptors (Receptores do tipo NOD)
Nrf2	Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Fator nuclear eritroide 2 relacionado ao fator 2)
PAMPs	Pathogen-associated molecular patterns (Padrões moleculares associados ao patógeno)
PGE ₂	Prostaglandin E ₂ (Prostaglandina E ₂)
PGHS	Prostaglandin endoperoxide-H synthase (Prostaglandina endoperóxido sintase)
p38-MAPK	p38 mitogen-activated protein kinase (Proteína cinase ativada por mitógeno p38)
p-STAT3	Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3 (Transdutores de sinal fosforilados e ativadores da expressão de transcrição 3)
PUFA	Polyunsaturated fatty acids (Ácidos graxos poliinsaturados)
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde

RLRs	Retinoic acid-induced gene I (RIG-I)-like receptors (Receptores do tipo RIG-I)
STATs	Signal transducers and activators of transcription (Transdutores de sinal e ativadores de transcrição)
TLRs	Toll-like receptors (Receptores Toll-like)
TNF	Tumor necrosis factor (Fator de necrose tumoral)
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato)
TRIF	TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β (Adaptador contendo o domínio TIR induzindo Interferon β)
UCP 2	Uncoupling protein 2 (Proteína desacopladora 2)
UHPLC-ESI-MS/MS	Rapid ultrahigh performance liquid chromatography-electrospray ionization tandem mass spectrometry (Cromatografia líquida de alta eficiência com ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massa sequencia)
v.o.	Via oral
ZKV	Zika vírus
5-HT	5-hydroxytryptamine (5-hidroxitriptofano ou serotonina)

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Annona squamosa* e da sua substância isolada, palmatina

RESUMO

A inflamação e a dor, um sinal cardinal da primeira, são processos complexos, que envolvem diversas vias de sinalização e tipos celulares. A sua desregulação, entretanto, serve como base para o desenvolvimento de diversos tipos de doenças e causam uma considerável carga aos sistemas de saúde. Além disso, o tratamento farmacológico para a inflamação e dor possuem diversos efeitos colaterais graves. Considerando a necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, o estudo das propriedades farmacológicas das plantas medicinais e das suas substâncias isoladas podem ser uma boa opção. As folhas, ou todas as partes da *Annona squamosa*, também conhecida popularmente como fruta-do-conde, pinha, custard apple, ou, seetha pazham, são utilizadas pela população para tratar a dor e contra a artrite. Além disso, a palmatina, um alcaloide isolado das folhas de *A. squamosa*, possui diversas ações farmacológicas já descritas na literatura científica. O seu potencial, anti-inflamatório e analgésicos, entretanto, ainda não foi completamente elucidado. Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito analgésico (antinociceptivo e antihiperálgico), antiartrítico e anti-inflamatório, através de modelos animais de inflamação, relacionados com a nocicepção e hiperálgia, e a viabilidade leucocitária, *in vitro*, do extrato metanólico das folhas de *Annona squamosa* e da palmatina. Para realizar isso, inicialmente, o extrato metanólico da *A. squamosa* (EMAS) foi preparado e submetido a uma análise química (perfil químico e presença de alcaloides), através da cromatografia líquida de ultra alta eficiência com ionização por eletrospray acoplado a espectrometria de massa sequencial (UHPLC-ESI-MS/MS). Além disso, o EMAS (30, 100 e 300 mg/kg) e a palmatina (0,3, 1 e 3 mg/kg) foram administrados, por via oral (v.o.), no teste de pleurisia induzida por carragenina, onde foram analisados migração leucocitária, extravasamento de proteínas e níveis de óxido nítrico (NO). O EMAS (100 mg/kg, v.o.) e a palmatina (1 mg/kg, v.o.), foram testados na artrite induzida por zymosan e no teste de formalina. Além disso, os animais foram tratados com 3 e 30 µg/pata de palmatina, para avaliar a ação dessa substância sobre a hiperálgia mecânica induzida pelo fator de necrose tumoral (TNF), 3 e 4h após a aplicação dessa citocina. A viabilidade dos leucócitos tratados com EMAS e palmatina foi avaliado, *in vitro*, através do teste de MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2, 5-difenil-2H-tetrazólio). Entre os resultados desses testes, a análise do perfil químico demonstrou a presença de três alcaloides:

palmatina, lirioidenina e anonaina. Na pleurisia induzida por carragenina, o tratamento com o EMAS (100 e 300 mg/kg) e a palmatina (1 e 3 mg/kg) inibiu significativamente a migração leucocitária e a produção de NO. O EMAS e a palmatina inibiram os parâmetros (hiperalgesia mecânica, migração leucocitária e o edema) da inflamação articular induzida por zymosan. No teste de formalina, o EMAS (100 mg/kg) e a palmatina (1mg/kg) inibiram a hiperalgesia mecânica e ao frio. Além disso, a palmatina reduziu a nocicepção da segunda fase (fase inflamatória) do teste de formalina. Através do tratamento intraplantar de palmatina (3 e 30 µg/pata), a hiperalgesia mecânica foi inibida 3 e 4 horas após a aplicação do fator de necrose tumoral (TNF). Além disso, o EMAS e a palmatina não apresentaram citotoxicidade *in vitro*. Considerando isso, pode-se concluir que o EMAS e a palmatina possuem ação analgésica, antiartrítica e anti-inflamatória, o que pode explicar, em parte o uso popular dessa planta no tratamento da dor e da artrite.

Palavras chaves: Alcaloides, plantas medicinais, anti-hiperalgésico, inflamação, artrite.

Anti-inflammatory and antinociceptive activity of the methanolic extract of *Annona squamosa* leaves and its isolated substance, palmatine

ABSTRACT

Inflammation and the pain, a cardinal sign of the former, are complex processes involving multiple signaling pathways and cell types. Its deregulation, however, serves as a basis for the development of different types of diseases and causes a considerable burden on health systems. Moreover, the pharmacological treatment for inflammation and pain has several severe side effects. Considering the need of developing new medicines, the study of pharmacological properties from medicinal plants and their isolated substances could be a good option. The leaves, or the entirety of *Annona squamosa*, also popularly known as custard apple, pine cone, custard apple, or, seetha pazham, are used by the population to treat pain and arthritis. Furthermore, palmatine, an alkaloid isolated from *A. squamosa* leaves contains several pharmacological effects already described in scientific literature. Its anti-inflammatory and analgesic potential, however, has not yet been fully elucidated. Considering this information, this paper aimed to evaluate the analgesic (anti-nociceptive and antihyperalgesic), antiarthritic and anti-inflammatory effect, through animal models of inflammation, related to nociception and hyperalgesia, and the leukocyte viability, *in vitro*, of the methanolic extract from *Annona squamosa* leaves and palmatine. In order to achieve the goal, at first, the *A. squamosa* methanolic extract was prepared and submitted to a chemical analysis (chemical profile and presence of alkaloids), through ultra-high performance liquid chromatography with electrospray ionization coupled to sequential mass spectrometry (UHPLC -ESI-MS/MS). In addition, EMAS (30, 100 and 300 mg/kg) and palmatine (0.3, 1 and 3 mg/kg) were administered orally in the carrageenan-induced pleurisy test where leukocyte migration, protein extravasation and Nitric Oxide (NO) levels were analyzed. EMAS (100 mg/kg) and palmatine (1 mg/kg), administered orally, were tested in zymosan-induced arthritis (joint inflammation) and in formalin models. Furthermore, the animals were treated with 3 and 30 µg/paw of palmatine, to evaluate this substance's actions on the mechanical hyperalgesia induced by tumor necrosis factor (TNF), 3 and 4 hours after the application of this cytokine. Leukocytes viability treated with EMAS and palmatine was evaluated *in vitro* using MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium) test. Among these tests results, the analysis of the chemical profile. In carrageenan-induced pleurisy, treatment with EMAS (100 and 300 mg/kg) and palmatine (1 and 3 mg/kg)

significantly inhibited leukocyte migration and NO production. EMAS and palmatine inhibited parameters (mechanical hyperalgesia, leukocyte migration and edema) of zymosan-induced joint inflammation. In the formalin test, EMAS (100 mg/kg) and palmatine (1mg/kg) inhibited mechanical and cold hyperalgesia. Moreover, palmatine reduced the nociception of formalin test's second phase (inflammatory phase). Through palmatine's intraplantar treatment (3 and 30 μ g/paw), mechanical hyperalgesia was inhibited 3 and 4 hours after tumor necrosis factor (TNF) administration. Therewithal, EMAS and palmatine did not show cytotoxicity in vitro. Considering these results, it can be concluded that EMAS and palmatine have analgesic, anti-arthritic and anti-inflammatory effects, which may partly explain this plant's popular use in pain and arthritis treatments.

Keywords: Alkaloid, medicinal plants, Anti-hyperalgesic, Inflammation, arthritis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1 Inflamação	14
2.2 Dor	16
2.2.1 Dor inflamatória	18
2.3 Anti-inflamatórios e analgésicos	19
2.4 Plantas medicinais	22
2.5 <i>Annona squamosa</i>	23
2.5.1 Informações botânica	23
2.5.2 Características das folhas de <i>Annona squamosa</i>	25
2.5.3 Atividades biológicas	26
2.5.4 Substâncias isoladas	28
2.6 Alcaloides	31
2.6.1 Farmacocinética da palmatina	32
2.6.2 Atividades biológicas da palmatina	32
2.6.2 Mecanismos de ação na dor e inflamação	35
2.7 Modelos animais de inflamação e dor	35
3 OBJETIVOS	36
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	37
5 APÊNDICES	53
5.1 Artigo 1: Analgesic and anti-arthritic properties of methanolic extract and palmatine obtained from <i>Annona squamosa</i> - submetido a revista Journal of Ethnopharmacology (Qualis A2; FI: 4.360)	56
6 Conclusão	95
7 Anexos	96
7.1 Aprovação pela Comissão de ética no uso de animais - CEUA	97
7.2 Comprovante de Cadastro de Acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen)	98

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo complexo, que, quando desregulada, pode propiciar o desenvolvimento de diversas doenças graves, sendo umas das principais sintomatologias, a dor e hiperalgesia, um dos sinais cardinais da inflamação (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; FURMAN *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2021).

Entre os principais medicamentos para tratar a dor, pode-se citar os analgésicos opioides e os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs). O seu uso prolongado, entretanto, pode causar diversos efeitos colaterais graves, como a dependência induzida por opioides e, no caso dos AINEs, úlceras gástricas e complicações renais (ATKINSON; FUDIN, 2020; BERTIN *et al.*, 2021; BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020). O tratamento farmacológico da inflamação, por sua vez, possui diversos efeitos adversos, como é o caso dos AINEs e dos glicocorticoides (insuficiência adrenal, resistência à insulina, entre outros) (BARNES; ADCOCK, 2009; QUATRINI; UGOLINI, 2020).

Nesse cenário, as plantas medicinais são uma opção para desenvolver novos fármacos, ou fitoterápicos, ou produtos que diminuam a sintomatologia de doenças inflamatórias (ATTIQ; JALIL; HUSAIN, 2017). As folhas da *Annona squamosa*, também conhecida como fruta-do-conde, ata ou pinha, são utilizadas pela população para tratar a dor e o reumatismo (GONÇALVES; PASA, 2015; QUÍLEZ *et al.*, 2018; VIJAYAKUMAR *et al.*, 2015).

Na literatura científica, tanto as folhas de *A. squamosa*, quanto as suas substâncias isoladas (palmatina), têm demonstrado o potencial farmacológico dessa planta medicinal, como antimicrobiano, antioxidante, anti-inflamatório e antinociceptivo (AL-NEMARI *et al.*, 2020; GUPTA *et al.*, 2008; KALIDINDI *et al.*, 2015; SINGH; MISHRA; MISHRA, 2012). Além disso, a palmatina, alcaloide isolado das folhas, possui um amplo espectro de efeitos farmacológicos já descritos na literatura (gastropotetor, antiproliferativo, hipolipemiante), entretanto, as atividades analgésicas (antinociceptiva e anti-hiperalgésica) e anti-inflamatória dessa substância não foram totalmente elucidadas (NING *et al.*, 2015; WANG *et al.*, 2017; YAN *et al.*, 2017).

Considerando isso, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil químico e a presença de alcaloides no extrato metanólico das folhas de *A. squamosa* (EMAS); avaliar o efeito analgésico (antinociceptivo e anti-hiperalgésico) e anti-inflamatório, mediada por diferentes agentes indutores da inflamação (zymosan, carragenina) e nocicepção (formalina), assim como a viabilidade leucocitária, *in vitro*, através do teste de MTT.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta protetora que defende e restaura as funções fisiológicas quando os mecanismos homeostáticos são insuficientes (KOTAS; MEDZHITOV, 2015; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Ela é uma rede regulatória complexa envolvendo diversas vias de sinalização, células imunes inatas, adaptativas e teciduais (GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; PERRETTI *et al.*, 2017; ZARRIN *et al.*, 2021).

Além disso, ela é clinicamente reconhecida pelos seus cinco sinais cardinais, rubor, calor, turgor, perda de função e dor, e pode ser classificado, de acordo com a região afetada, em local e sistêmica (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017), ou, de acordo com a sua duração, em aguda e crônica (FURMAN *et al.*, 2019; PERRETTI *et al.*, 2017).

Em condições normais, a inflamação é um processo fisiológico de defesa benéfico, controlado e homeostático (LEE *et al.*, 2020; MEDZHITOV, 2008). A desregulação desse processo (inflamação patológica), entretanto, é uma resposta mal adaptada, mantida à custa de outros processo fisiológicos (FULLERTON; GILROY, 2016; MEDZHITOV, 2008; PERRETTI *et al.*, 2017).

De modo simplificado, a inflamação é desencadeada através dos indutores (exógeno ou endógeno), que iniciam a resposta inflamatória ao ativar os sensores específicos (receptores). Isso, por sua vez, promove a produção de uma variedade específica de mediadores, que alteram o estado funcional do tecido ou células locais (efetores) e desencadeiam a inflamação (FURMAN *et al.*, 2019; JOOSTEN *et al.*, 2016; MEDZHITOV, 2008).

Os indutores da inflamação podem ser classificados em padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs) (FURMAN *et al.*, 2019; MEDZHITOV, 2008; NETEA *et al.*, 2017). Sendo alguns exemplos disso, infecções microbianas, no caso dos PAMPs (fatores exógenos), e, estímulos nocivos físicos, químicos ou metabólicos, no caso dos DAMPs (fatores endógenos) (FURMAN *et al.*, 2019; NETEA *et al.*, 2017).

Entre os receptores que reconhecem esses padrões moleculares, pode-se citar os receptores Toll-like (TLRs); receptores do tipo NOD (NLRs) e os receptores do tipo RIG (RLRs) (JOOSTEN *et al.*, 2016; LI; CHANG, 2021). Eles, por sua vez, estimulam a produção

dos mediadores inflamatórios através de diversos mecanismos regulatórios, como é caso dos seguintes fatores de transcrição: fator nuclear kappa B (NF- κ B), transdutores de sinal e ativadores de transcrição (STATs), fator nuclear de células T ativadas (NFATs) e fatores reguladores de interferon (IRF) (ZARRIN *et al.*, 2021).

Os mediadores da inflamação possuem efeitos distintos em diferentes tipos celulares e possuem um papel importante na formação do exsudato (quimiotaxia), na função neuroendócrina e metabólica do tecido afetado (MEDZHITOV, 2008). E, de acordo com as suas propriedades bioquímicas, eles podem ser classificados em aminas vasoativas (histamina), peptídeos (bradicinina), fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos (eicosanoides), citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (MEDZHITOV, 2008; PERRETTI *et al.*, 2017). As aminas vasoativas (histaminas), por exemplo, estão presentes nos mastócitos e plaquetas, e, quando liberadas, aumentam a permeabilidade vascular ou promovem a vasoconstrição, dependendo do estímulo (MEDZHITOV, 2008).

Os peptídeos vasoativos, por sua vez, são armazenados, na sua forma ativa (substância P), em vesículas secretoras, mas, podem ser geradas, também, através da proteólise de precursores inativos, como o fator de Hageman (fator XII), que, através da cascata de calicreína-cinina, produz bradicinina, um peptídeo vasoativo e estimulante da dor (BEKASSY *et al.*, 2021; MEDZHITOV, 2008). Além disso, fragmentos do sistema complemento, principalmente o C5a, promovem o recrutamento de granulócitos, monócitos e induzem a degranulação de mastócitos (MEDZHITOV, 2008).

As citocinas inflamatórias (TNF, IL-1 β e IL-6) e as quimiocinas, por sua vez, são produzidas por diversos tipos de células, promovendo a inflamação através da ativação do endotélio e leucócitos e estimulando o extravasamento vascular e a quimiotaxia (BRENNAN *et al.*, 2021; MEDZHITOV, 2008). Quanto a remodelação tecidual, as enzimas proteolíticas (elastina e metaloproteinases de matriz), desempenham um papel importante nesse processo (GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores lipídicos, também possuem uma função importante durante esse processo. Eles são produzidos através dos fosfolipídios presentes na membrana celular, como o ácido araquidônico (AA), um de ácidos graxo poliinsaturados (PUFAs) ômega 6, e os PUFAs ômega-3: ácido eicosapentaenoico (EPA) e ácido docosahexaenoico (DHA) (BRENNAN *et al.*, 2021; WANG, Bei *et al.*, 2021).

Para exercerem os seus efeitos, o AA, por exemplo, presente na membrana celular na sua forma esterificada, é hidrolisado pela fosfolipase A₂. O AA, na sua forma livre, por sua vez, pode ser metabolizado por três sistemas enzimáticos distintos, através das

ciclooxigenases (COXs), lipoxigenases (LOXs) e pelas enzimas do citocromo P450, que levam a produção de diversos mediadores bioativos, como prostanoídes, os ácidos hidroxieicosatetraenoícos e leucotrienos (BRENNAN *et al.*, 2021; MEDZHITOV, 2008; PERRETTI *et al.*, 2017; WANG, Bei *et al.*, 2021).

Uma vez que os PAMPs ou DAMPs tenham sido eliminado, vários mediadores endógenos anti-inflamatórios e pró-resolutivos iniciam processo de resolução e reparo, para restaurar a homeostasia do local (BRENNAN *et al.*, 2021; MEDZHITOV, 2008; PERRETTI *et al.*, 2017). Nesse período, a produção de mediadores lipídicos pró-resolutivos especializados é iniciado (BRENNAN *et al.*, 2021).

O AA, por exemplo, deixa de produzir mediadores lipídicos pró-inflamatórios (prostaglandinas) e começa a produção de lipoxinas anti-inflamatórias, um componente essencial remodelação tecidual (MEDZHITOV, 2008). Além do AA, outras fontes de PUFAs (EPA e DHA), também são capazes de produzir mediadores lipídicos com ação anti-inflamatória e pró-resolução, tais como as resolvinas, maresinas e protectinas, através da participação das enzimas LOX e COX (BRENNAN *et al.*, 2021; PERRETTI *et al.*, 2017). Entre os efeitos desses mediadores, pode-se citar a inibição do recrutamento de neutrófilos e a produção de moléculas protetoras do hospedeiro (IL-10; prostaglandina I₂) (PERRETTI *et al.*, 2017).

A resposta imunológica persistente e desregulada, resultante da hiperatividade da fase pró-inflamatória ou defeito na via pró-resolução, pode promover a inflamação crônica (CHIURCHIÙ; LEUTI; MACCARRONE, 2018; FULLERTON; GILROY, 2016; MEDZHITOV, 2008; PERRETTI *et al.*, 2017). Essa resposta, é caracterizada por ser persistente, de baixo grau, e, geralmente, associada aos DAMPS (FURMAN *et al.*, 2019; PERRETTI *et al.*, 2017).

A constante liberação de mediadores inflamatórios, durante a inflamação crônica, ocorre à custa de muitos outros processos fisiológicos (GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; MEDZHITOV, 2008). Razão pela qual, ela possui um papel central no desenvolvimento de diversas doenças grave como a diabetes tipo 2, aterosclerose, asma, psoríase, doenças neurodegenerativas (esclerose múltipla, doença de Alzheimer e doença de Parkinson), doença inflamatória intestinal e câncer (FRANK-CANNON *et al.*, 2009; GAESTEL; KOTLYAROV; KRACHT, 2009; KOTAS; MEDZHITOV, 2015; ROTH *et al.*, 2018; SERHAN, 2014).

2.2 Dor

A dor é um mecanismo defensivo, que pode ser classificada em aguda ou crônica, de acordo com a sua duração (MATSUDA; HUH; JI, 2019), ou, em neuropática e inflamatória, de acordo com o local de sinalização afetado (BARAL; UDIT; CHIU, 2019).

A dor aguda, por exemplo, é um processo de curta duração e tem como função evitar danos potenciais e proteger o tecido ferido, a dor crônica, por sua vez, é uma resposta mal adaptada, contínua, que supera o tempo normal de cura e não possui benefício algum (MATSUDA; HUH; JI, 2019). Sendo alguns exemplos disso, a dor presente na neuropatia diabética, artrite reumatoide, osteoartrite, síndrome do intestino irritável e na colite ulcerosa (BARAL; UDIT; CHIU, 2019). A dor crônica representa um grave problema de saúde global, que não afeta somente fatores biológicos, como também, econômicos, psicológicos e sociais (ARTHUR; BRUERA, 2019; COHEN; VASE; HOOTEN, 2021).

Além disso, dependendo da situação, a dor pode receber outras denominações, como é o caso da alodinia, uma resposta dolorosa estimulada por estímulos mecânicos ou térmicos normalmente inofensivos, e a hiperalgesia, caracterizada pela intensificação da dor a estímulo normalmente nocivos (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; MATSUDA; HUH; JI, 2019; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Como foi comentado anteriormente, a dor é um processo defensivo, que, em condições normais é de curta duração e rapidamente resolvida. Para que isso ocorra, a transmissão da dor deverá passar por duas fases: sensibilização periférica e central.

A primeira fase, sensibilização periférica, ocorre nas fibras A δ e C, também conhecidas como neurônios aferentes primários (nociceptores), que inervam os tecidos periféricos, como pele, osso, articulações e vísceras (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; PIOMELLI; SASSO, 2014; STEIN, 2016). Quando esse nociceptor é ativado por estímulos químicos, físicos, térmicos ou mecânico nocivos, um potencial de ação é gerado e transmitido pelas fibras A δ e C, até o corpo celular do nociceptor presente no gânglio de raiz dorsal (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; STEIN, 2016).

Assim que o potencial de ação alcança o terminal sináptico, os neurônios aferentes primários realizam a sinapse com o neurônio aferente secundário, no corno dorsal da medula espinhal, estimulando desse modo a sensibilização central da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Essa sinapse ocorre através do potencial de ação transmitido, que ao chegar no terminal sináptico do neurônio aferente primário, estimula a abertura dos canais de cálcio voltagem dependente e facilita a liberação

de neurotransmissores (CORDER *et al.*, 2018; STEIN, 2016). Isso, por sua vez, estimula os receptores pós-sinápticos AMPA (ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico) e NMDA (N-metil-D-aspartato), que transmitem o sinal nociceptivo ao sistema nervoso central, onde será reconhecido o estímulo nocivo (CORDER *et al.*, 2018).

2.2.1 Dor inflamatória

A dor e a inflamação interagem de modo complexo com diversos sistemas (imunológico, vascular, sistema nervoso central, periférico e autônomo) em resposta a lesão tecidual, patógenos e irritantes (MATSUDA; HUH; JI, 2019). Além disso, diversos mediadores da pró-inflamatórios promovem a sensibilização das vias da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A sensibilização das vias da dor, durante a inflamação, ocorre através da estimulação de células imunes (mastócitos, macrófagos, monócitos, neutrófilos e células T) e não neuronais (células epiteliais), que liberam mediadores pró-inflamatórios como citocinas, quimiocinas, mediadores lipídicos e fatores de crescimento, que estimulam os terminais periféricos de fibras nervosas nociceptivas primárias (sensibilização periférica) (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

Os neurônios aferentes primários, por sua vez, transmitem esse estímulo nocivo ao SNC através da sinapse com os neurônios nociceptivos secundário, que estão presentes no corno dorsal da medula espinhal (sensibilização central), sendo esse sinal retransmitidos ao cérebro para serem processados como dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017). Além disso, durante a inflamação, a nocicepção pode ser intensificada (hiperalgesia) ou desencadeada por estímulos inócuos (alodinia) (RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

A interação neuro-imune possui um papel importante na modulação das vias de sinalização periférica e central da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019). A produção de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas, fatores de crescimento pelas células T, micróglia e astrócitos, por exemplo, atuam sobre os terminais pré-sinápticos (neurônio primário) e pós-sinápticos (neurônio secundário), para aumentar a neurotransmissão e impulsionar a sensibilização central da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Entre os outros mediadores inflamatórios com papel importante na sensibilização da dor, pode-se citar os eicosanoides (prostaglandina E₂ e prostaciclina), produzidos através da

cascata do AA, e a bradicinina, que se liga ao seu receptor, presente nos nociceptores, e estimula a dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; BUCZYNSKI *et al.*, 2010; PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017; PIOMELLI; SASSO, 2014).

Além disso, a constante sensibilização de mediadores pró-inflamatórios, a longo prazo, pode conduzir a sensibilização da dor crônica e, perdurar, mesmo após a cura da lesão que causou a inflamação (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; RONCHETTI; MIGLIORATI; DELFINO, 2017).

2.3 Anti-inflamatórios e analgésicos

Nesta revisão, os principais fármacos utilizados no tratamento da dor e inflamação serão analisados. Entre eles os glicocorticoides (GCs), no tratamento da inflamação, os anti-inflamatórios não esteroides (AINES), utilizados no tratamento da dor (ação periférica) e inflamação, e os analgésicos opioides (ação central) (BERTIN *et al.*, 2021; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Os GCs são hormônio esteroides endógenos com ação em diversos sistemas e processos metabólicos, razão pela qual os seus homólogos sintéticos são amplamente utilizados como imunossupressor e anti-inflamatório (HOES *et al.*, 2010; QUATRINI; UGOLINI, 2020; WILLIAMS, 2018). Entre as suas aplicações clínicas, pode-se citar tratamento de diversas doenças inflamatórias e autoimunes, como artrite reumatoide, alergia, sepse, asma e na prevenção da rejeição de transplantes (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019).

A sua administração prolongada, entretanto, constitui um grande fator limitante, pois os efeitos pleiotrópico dos GCs, propiciam a ocorrência de distúrbios metabólicos (hipertensão, diabetes, dislipidemia, hiperglicemia e insuficiência adrenal), disfunção dos tecidos (osso, pele, músculo esquelético), distúrbios psiquiátricos, maior risco de infecções e resistência a GCs (BARNES; ADCOCK, 2009; CLAYTON *et al.*, 2018; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; QUATRINI; UGOLINI, 2020; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019)

Para exercer os seus efeitos farmacológicos, os GCs, uma substância lipofílica, se difundem na membrana plasmática das células e realizam uma ligação com o receptor de glicocorticoides presentes no citoplasma (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013). Esse receptor, por sua vez, é liberado das proteínas chaperonas, ao qual estava acoplada anteriormente, e são translocados ao núcleo (CLAYTON *et al.*, 2018; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT,

2019). Além disso, os receptores de glicocorticoides podem atuar, também, através de mecanismo não genômicos (KIM, S. W. *et al.*, 2001; OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013).

Uma vez no núcleo da célula, os GCs induzem a estimulação (transativação) ou inibição (transrepressão) da transcrição genética de diversos fatores envolvidos com a inflamação (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019). Como a transrepressão de fatores de transcrição (NF- κ B), envolvidos com a expressão de mediadores pró-inflamatórios: COX-2, o óxido nítrico sintase induzível e citocinas pró-inflamatórias (OAKLEY; CIDLOWSKI, 2013; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019; WILLIAMS, 2018). Como também, a transativação de diversos genes anti-inflamatórios (TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019).

Além disso, os GCs regulam positivamente a anexina 1, um peptídeo anti-inflamatório, que inibe a fosfolipase A₂ e reduz, desse modo, a produção de prostaglandinas e leucotrienos, através da cascata do AA (CHEN, L.; LV; PEI, 2014; KIM, S. W. *et al.*, 2001; WILLIAMS, 2018).

Ainda nos fármacos anti-inflamatório, é interessante, comentar sobre os AINES. Eles são um dos fármacos mais prescritos no tratamento da inflamação e dor, podendo ser utilizados, também, para outros fins terapêuticos como antipirético e antitrombótico (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020; CANNON; CANNON, 2012; SALA *et al.*, 2018). O seu uso a longo prazo, entretanto, pode causar diversos efeitos colaterais graves como irritação gastrointestinal (ulceração e hemorragia), eventos cardiovasculares (aumento do risco tromboembólico), entre outras complicações renais, hepáticas, cerebrais e pulmonares (ATKINSON; FUDIN, 2020; BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020).

Os mecanismos de ação pelas quais os AINES exercem seus efeitos, ocorrem através da inibição das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2), uma enzima responsável pela produção de mediadores lipídicos, como prostaglandinas, tromboxano, prostaciclina, que regulam a inflamação e sensibilizam as vias da dor (BARAL; UDIT; CHIU, 2019; BRÆNNE *et al.*, 2017; CANNON; CANNON, 2012; JU *et al.*, 2022).

Além disso, dependendo da seletividade do AINES em relação a COX, eles podem ser classificados em inibidores não seletivos da COX e em inibidores seletivos da COX-2 (COXIBES), ambos, entretanto, possuem efeitos adversos graves (JU *et al.*, 2022; SALA *et al.*, 2018). A inibição não seletiva da COX, por exemplo, pode inibir a produção de prostaglandina gastroprotetora pela COX-1, favorecendo o desenvolvimento de úlceras gástrica (CANNON; CANNON, 2012; JU *et al.*, 2022; SALA *et al.*, 2018).

Posteriormente, com a finalidade de reduzir os efeitos colaterais causados pela inibição da COX-1, os inibidores seletivos da COX-2 (COXIBES) foram desenvolvidos (CANNON; CANNON, 2012; SALA *et al.*, 2018). Essa inibição seletiva, entretanto, aumentou o risco de eventos cardiovasculares, devido ao bloqueio na produção de mediadores com efeitos vasodilatadores e antiplaquetários, catalisada por COX-2, sem a inibição de tromboxano A₂, um agregante plaquetário e vasoconstritor, catalisado pela COX-1 (BRÆNNE *et al.*, 2017; CANNON; CANNON, 2012; SALA *et al.*, 2018; SCHMIDT *et al.*, 2016).

Os analgésicos opioides estão entre os analgésicos mais antigos e mais utilizados para tratar a dor (aguda e crônica) e, ao contrário dos AINES, os opiáceos são capazes de regular as vias de sinalização central e periférica da dor (ARNOLD *et al.*, 2021). Esses medicamentos, entretanto, são altamente viciantes e podem causar, a longo prazo, diversas complicações graves como tolerância, constipação e hiperalgesia induzida por opioides (ARNOLD *et al.*, 2021; ARTHUR; BRUERA, 2019; MÉLIK PARSADANIANTZ *et al.*, 2015).

O sistema opioide possui um papel importante na regulação da dor (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011). Os seus efeitos ocorrem através da ligação dos peptídeos opiáceos com os receptores de opioides (proteínas transmembrana acopladas a proteína G), promovendo o alívio da dor através do sistema nervoso central e periférico (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; FAOUZI; VARGA; MAJUMDAR, 2020).

Além disso, os receptores opioides são divididos em quatro sistemas distintos de receptores, mu (μ), delta (δ), kappa (κ) e receptor peptídico opioide nociceptiva, que, quando ativados, exercem efeitos na analgesia, recompensa, depressão, ansiedade e dependência (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; FAOUZI; VARGA; MAJUMDAR, 2020; MÉLIK PARSADANIANTZ *et al.*, 2015).

Dentre eles o receptor opioide μ , o principal alvo dos opioides usados no tratamento da dor, e o receptor κ , possuem um papel importante na analgesia por opioides endógenos e exógenos (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; FAOUZI; VARGA; MAJUMDAR, 2020; ZHANG, Xin-Yan *et al.*, 2020). O seu uso terapêutico, porém, pode ser limitado pelos seus efeitos adversos, como tolerância, dependência, constipação, e depressão respiratória, no caso dos analgésicos seletivos aos receptores opioides μ , e sedação, ansiedade, disforia e alucinações, no caso dos analgésicos seletivos aos receptores κ (FAOUZI; VARGA; MAJUMDAR, 2020).

Os receptores de opioides estão presentes no corno dorsal da medula espinhal, nas vias descendentes da dor, nas estruturas límbicas, mesencefálica e corticais (AL-HASANI; BRUCHAS, 2011; MÉLIK PARSADANIANTZ *et al.*, 2015).

Uma vez que os receptores são ativados, por opioides endógenos (encefalinas) ou exógenos (morfina), promovem analgesia através da dissociação das subunidades inibitórias da proteína G: $G\alpha$ e $G\beta\gamma$ (CORDER *et al.*, 2018). A subunidade $G\alpha$, por exemplo, suprime a liberação de neurotransmissores (substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e glutamato) pré-sinápticos, enquanto a subunidade $G\beta\gamma$ hiperpolariza os neurônios através da modulação dos canais iônicos (CORDER *et al.*, 2018; MÉLIK PARSADANIANTZ *et al.*, 2015).

2.4 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais é praticada desde tempos antigos, inicialmente desenvolvido de modo empírico, e, posteriormente, transformado em fatos explicativos, que foram transmitidos, melhorados e ampliados, de modo contínuo, de geração a geração, até a atualidade (PETROVSKA, 2012; ŠANTIĆ *et al.*, 2017). Fontes históricas de diversas sociedades (chineses, egípcios, índios, gregos, entre outros), em distintas épocas, registraram evidências sobre o uso de plantas medicinais como opção terapêutica para uma variedade de doenças (PETROVSKA, 2012; ŠANTIĆ *et al.*, 2017).

No Brasil, a diversidade étnica, cultural e socioeconômica favorece o uso de plantas medicinais vinculado ao conhecimento popular (SARAIVA *et al.*, 2015). Além desses fatores, a vasta cobertura vegetal e a grande biodiversidade, tornam o Brasil um país com grande potencial para a produção de medicamentos à base de plantas medicinais (SARAIVA *et al.*, 2015).

Quanto a sua utilização, dependendo de como a espécie vegetal é administrada, diferentes classificações podem ser feitas. De acordo com o principal órgão que regula as plantas medicinais e seus derivados, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), espécies vegetais, cultivada ou não, para fins terapêuticos são definidas como plantas medicinais (BRASIL, 2011). Os fitoterápicos, por sua vez, são matérias primas vegetais, proveniente de uma ou mais plantas, com estudos que comprovam a sua eficácia e segurança (BRASIL, 2014), enquanto substâncias, isoladas ou purificadas, com estrutura química e atividade farmacológica definida, são denominados como fitofármacos (BRASIL, 2011, 2014)

Com o objetivo de promover o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos; incentivar o uso sustentável da biodiversidade e fortalecer a indústria farmacêutica, diversas ações têm sido desenvolvidas, entre elas a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, publicada em 2006 (BRASIL, 2006); o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada em 2008 (BRASIL, 2009a) e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS), que contém uma lista com 71 espécies de plantas medicinais (BRASIL, 2009).

Além disso, de acordo com uma revisão de literatura, realizada de 2010 a 2013, dentre as plantas presentes na lista do RENISUS, 20 espécies possuem potencial anti-inflamatória comprovado e, das quais 8 são nativas do Brasil e 3 espécies estão disponíveis no Sistema Único de Saúde como fitoterápico (*Aloe vera*, *Schinus terebenthifolius* e *Uncaria tomentosa*) (MARMITT *et al.*, 2015).

Apesar disso, o Brasil ainda depende fortemente da importação de insumos farmacêuticos (SARAIVA *et al.*, 2015). Sendo uma das razões disso, o baixo desenvolvimento da indústria nacional de fitofármaco, o que dificulta a competição com a indústria internacional; a pouca integração de diferentes áreas do conhecimento (botânica, farmacologia, química, bioquímica, entre outros) e a necessidade de um maior incentivo governamental, no uso de plantas medicinais e fitoterápicos (SARAIVA *et al.*, 2015; YUNES; PEDROSA; CECHINEL FILHO, 2001).

2.5 *Annona squamosa*

2.5.1 Informações botânica

A família Annonaceae possui cerca de 180 gêneros com mais de três mil espécies distribuídas ao redor do mundo (ATTIQ; JALIL; HUSAIN, 2017). No Brasil, essa família possui cerca de 26 gêneros (sete endêmicos), com 260 espécies (MAAS *et al.*, 2001). Entre elas, a *Annona* é um dos maiores gêneros dessa família, sendo representado por plantas lenhosas, de porte arbóreo ou arbustivo, que se distribuem em regiões tropicais e subtropicais (ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2020; KIILL; COSTA, 2003).

Além disso, as espécies do gênero *Annona* (família Annonacea) possuem uma grande importância econômica e científica (ANAYA-ESPARZA *et al.*, 2020). Sendo um exemplo disso, a *Annona squamosa* Linn, uma planta exótica brasileira, oriunda da América Central, frequentemente cultivada no Brasil e consumidas *in natura* (ABE; OHTANI, 2013; LI; XING, 2016; MAGALHÃES *et al.*, 2019).

A *A. squamosa* é uma árvore que cresce de 3 a 8 metros, possui folhas finas (5-17 cm de comprimento e 2-6 cm de largura), ramos largos e irregulares e casca de cor castanho claro (KALIDINDI *et al.*, 2015). A floração ocorre durante a primavera até o início do verão, sendo caracterizada pelo seu aspecto amarelo esverdeado e por serem pendentes, axilares, isoladas, hermafroditas, com cálice e corola trímeras (KALIDINDI *et al.*, 2015; KIILL; COSTA, 2003). Após a polinização das flores, as frutas, de formato redondo ou na forma de coração, levam cerca de 90 dias para serem completamente desenvolvidas (KALIDINDI *et al.*, 2015; KIILL; COSTA, 2003). A fruta amadurecida, apresenta uma coloração amarelo esverdeado e, internamente, a polpa possui uma cor amarelo esbranquiçada, de aspecto granulado, cremosa, aromática, comestível, rica em açúcares e com sementes oblonga, lisa de coloração marrom-escuro a preta (GONÇALVES; PASA, 2015; KALIDINDI *et al.*, 2015; KIILL; COSTA, 2003).

Além disso, a fusão da *A. squamosa* com a *Annona cherimola* (Cherimoia), tem formado uma nova fruta híbrida comestível, a Atemoia (SANTOS *et al.*, 2016). Ela vem ganhando interesse dos produtores graças ao seu sabor, por possuir menos sementes, melhor conservação, ausência de fissuras e pela sua maior resistência a plantas e outros organismos daninhos a planta (SANTOS 2016).

A *A. squamosa* possui diferentes nomes populares em diferentes países, como custard apple (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014) ou sugar apple (SUWARDI *et al.*, 2020); atis, nas Filipinas (ABE; OHTANI, 2013; ONG; KIM, 2014), seetha pazham ou seetha maram, na Índia (CHINNASAMY; ARUMUGAM; ARIYAN, 2019; YABESH; PRABHU; VIJAYAKUMAR, 2014), yáng nai, na China (LI; XING, 2016), ata, pinha-mansa ou fruta-do-conde, no Brasil (MAGALHÃES *et al.*, 2019; RIBEIRO *et al.*, 2017; SOUZA; LORENZI, 2005).

Quanto ao uso popular da *Annona squamosa*, diferentes partes dessa planta são utilizadas para diversas finalidades. Nas Filipinas, por exemplo, a casca dessa planta é utilizada como cicatrizante (uso tópico), enquanto as folhas são utilizadas para tratar a febre, através de compressa fria sobre a cabeça; no tratamento da dificuldade miccional (decoção); caxumba (cataplasma); cefaleia (cataplasma) e contra a ascaridíase (aplicação das folhas esmagadas ao redor das orelhas e estômago) (ABE; OHTANI, 2013; ONG; KIM, 2014).

Na Índia, o uso de todas as partes da planta é útil no tratamento da dor corporal (suco) e para o crescimento capilar (YABESH; PRABHU; VIJAYAKUMAR, 2014). As folhas, por sua vez, são úteis no tratamento da diabetes (decoção) (CHINNASAMY; ARUMUGAM; ARIYAN, 2019; PRABHU *et al.*, 2014) e doenças de pele, na forma de pasta ou via oral,

enquanto o consumo da fruta reduz a dor menstrual (SILAMBARASAN *et al.*, 2017). Diferentes partes da planta, raiz, folhas, frutas e sementes, são utilizadas, através de diferentes preparações (pó, suco, chá), para tratar distúrbios espinhais, depressão, ansiedade e como refrescante (SIVASANKARI; ANANDHARAJ; GUNASEKARAN, 2014).

Além disso, as folhas são úteis, também, no tratamento da linfadenopatias, doenças hepática, flatulência, cefaleia, contra o reumatismo e como anti-inflamatório (LI, Dong-lin; XING, 2016; LONGUEFOSSE; NOSSIN, 1996; QUÍLEZ *et al.*, 2018).

No Brasil, o seu uso popular foi relatado em duas regiões distintas: no Nordeste (caatinga) e no Mato Grosso (MT). Nesse estado (MT), a *A. squamosa* é utilizada para tratar labirintite e mordida de cobra através da infusão ou decocção das folhas e da casca da árvore (RIBEIRO *et al.*, 2017). No nordeste brasileiro, ela é utilizada para tratar doenças digestivas, hemorroidas e como inseticida, através de diferentes preparações: folha macerado em água, infusão e suco (MAGALHÃES *et al.*, 2019).

É importante ressaltar, entretanto, relatos de efeitos colaterais e precauções associados as sementes dessa planta: são utilizadas como veneno de rato; possuem maior risco de aborto e toxicidade ocular (CHINNASAMY; ARUMUGAM; ARIYAN, 2019; PRABHU *et al.*, 2014). Na Índia, por exemplo, a utilização do pó das sementes para tratar queda de cabelo, acne ou combater os piolhos, resultou no relato de 6 casos de toxicidade ocular (ceratoconjuntivite tóxica), que teve como sintomatologia dor intensa, vermelhidão, lacrimejamento e fotofobia, 6 a 24 horas após exposição ocular (NAGARAJA *et al.*, 2016).

2.5.2 Características das folhas de *A. squamosa*

As folhas de *Annona squamosa* são finas, claras, com 5 a 17 cm de comprimento e 2 a 6 cm de largura, possuem um formato oval lanceolada e uma coloração verde brilhosa em ambos os lados (KALIDINDI *et al.*, 2015; MAINASARA *et al.*, 2018). Além disso, do ponto de vista anatômico, as seções transversais das folhas de *Annona squamosa*, podem ser divididas em duas partes distintas, lâmina e nervura central (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

A nervura central da folha, está presente abaixo da epiderme superior e acima da epiderme inferior, sendo composta por duas camadas de células colênquima, superior e inferior, que representam a hipoderme (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). Nessa região, entre as duas camadas de colênquima, há células da medula que encerram cavidade secretoras lisígenas e ajudam a armazenar o conteúdo mucilaginoso (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

As folhas apresentam, também, feixes vasculares colaterais, fechados, cheios de xilema, que estão distribuídas na forma de arco aberto em direção a epiderme superior, e floema, que está distribuído em direção a epiderme inferior (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). Além disso, os feixes vasculares são atravessados radialmente pelo parênquima intravascular ou interfascicular, conectando a parte central da medula com a parte externa da nervura central (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

A lâmina das folhas, por sua vez, possui três regiões: *viz*, epiderme superior, epiderme inferior e mesofilo (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). A epiderme superior, por exemplo, é uma camada contínua de células com paredes retas revestida por espessamento cuticular com pelos estrelados, enquanto a epiderme inferior apresenta uma parede celular ondulada, com cabelos simples ou estrelados (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). Além disso, cristais estrelados, prismáticos, quadrados ou aglomerados podem ser encontrados tanto nas células da epiderme superior, quanto na inferior (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

Além dessas camadas, pode-se citar, também, o tecido mesofilo (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). Esse tecido apresenta dois tipos de parênquima: paliçádico e esponjoso. O primeiro, presente na parte superior, é composto por duas camadas de células tubulares em paliçada contendo cloroplastídeos (CHELLAPPAN *et al.*, 2005). O segundo, o parênquima esponjoso, está presente na parte inferior do tecido mesofilo, sendo composto por células parenquimatosas esponjosas ovais e circulares, que fecham os espaços intercelulares preenchidos com ar (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

Pode ser observado, também, a presença de cordões vasculares com feixes laterais, que ajudam no transporte de água e nutrientes à folha, e grupos de esclereides, no parênquima esponjoso da lâmina, que conferem resistência mecânica às folhas (CHELLAPPAN *et al.*, 2005).

2.5.3 Atividades biológicas

Levando em consideração os usos populares da *A. squamosa*, há diversos estudos pré-clínicos que comprovam as suas atividades biológicas. Estudos *in vitro*, por exemplo, demonstraram que o extrato metanólico das folhas dessa planta possuem, tanto ação antibacteriana contra bactérias Gram – (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* e *Salmonella typhimurium*) e Gram + (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*), quanto ação antioxidante (AL-NEMARI *et al.*, 2020; CHEN, Yong *et al.*, 2012)

Utilizando diferentes agentes extratores (metanol, água e clorofórmio), as folhas da *A. squamosa* apresentaram ação antifúngica contra *Alternaria alternata*, *Candida albicans*, *Fusarium solani*, *Microsporum canis* e *Aspergillus niger* (KALIDINDI *et al.*, 2015). O extrato metanólico das folhas, por sua vez, apresentou ação antiproliferativo contra linhagens celulares associadas a leucemia (Jurkat e HL60) (PINTO *et al.*, 2017), enquanto o extrato aquoso, cetônico e metanólico das folhas, inibiram as linhagens celulares relacionadas com o câncer de cólon, Lovo e HCT-116 (AL-NEMARI *et al.*, 2020).

Utilizando outra parte da planta, o extrato metanólico e etanólico das sementes apresentaram ação contra a linhagem celular Jurkat (leucemia), MCF-7 (câncer de mama) e Hep G2 (hepatoma) (CHEN *et al.*, 2012; PINTO *et al.*, 2017). O óleo obtido do pericarpo também apresentou efeito antitumoral contra o hepatoma *in vitro* e *in vivo* (CHEN *et al.*, 2020)

Além disso, diversos estudos em animais têm demonstrado as propriedades farmacológicas da *A. squamosa*, como antidiabético, antitumoral, gastroprotetor, anti-inflamatório e antinociceptivo (CHEN *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2008; UMAMAHESHWARI *et al.*, 2008; YADAV *et al.*, 2011)

O tratamento diário do extrato etanólico das folhas, por 10 e 15 dias, em ratos diabéticos (induzida por estreptozotocina) e coelhos diabéticos (induzidos por aloxano), respectivamente, apresentaram bons efeitos hipoglicemiantes e antidiabético (GUPTA *et al.*, 2005). Além disso, a administração do extrato aquoso das folhas (350 mg/kg/dia), por 30 dias, apresentou atividade antioxidante e hipolipemiante, no modelo de diabetes tipo 2 induzida por estreptozotocina em ratos (GUPTA *et al.*, 2008).

Os animais tratados com o extrato aquoso das folhas apresentaram, também, uma melhora no perfil lipídico e os tecidos coletados tiveram uma redução nos níveis de malondialdeído e aumento na atividade de enzimas antioxidantes, como catalase, superóxido dismutase, glutatona reduzida, glutatona redutase e glutatona transferase (GUPTA *et al.*, 2008).

Utilizando uma outra parte da planta, o óleo das sementes, apresentou ação antitumoral contra células H₂₂ em camundongos, sendo um dos possíveis mecanismo de ação, a diminuição da expressão de interleucina-6 (IL-6), Janus quinase (Jak) e transdutores de sinal fosforilados e ativadores da expressão de transcrição (p-STAT3) (CHEN *et al.*, 2016).

Além disso, o extrato metanólico da casca de *A. squamosa* apresentou efeito gastroprotetor e antiulcerogênico em distintos modelos de úlcera duodenal induzida por histamina, álcool, aspirina, ligadura pilórica, sendo um dos mecanismos de ação envolvidos

com esse efeito a inibição da atividade da bomba de prótons ($H^+ K^+$ -ATPase) e fortalecimento simultâneo do mecanismo de defesa da mucosa (YADAV *et al.*, 2011). O extrato etanólico e aquoso da casca, por sua vez, apresentaram ação antígenotóxico em modelos animais induzido por 7,12-dimetilbenzantraceno (DMBA) (SURESH; MANOHARN; BLESSY, 2008).

Considerando o uso popular dessa planta como inseticida e pela comprovação dos seus efeitos na casca da fruta e nas sementes (MADHUMITHA *et al.*, 2012), Grover e colaboradores (2009), avaliaram a genotoxicidade do inseticida produzido através das sementes de *A. squamosa*. Nela foi observado um aumento significativo no número de aberração cromossômica nas células medula óssea (teste de cometa), micronúcleos em eritrócitos e aumento na peroxidação lipídica (GROVER *et al.*, 2009).

Além disso, estudos anteriores sobre a atividade da *Annona squamosa* contra a inflamação e a dor, relataram a ação anti-inflamatória da casca da fruta, que reduziu a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α e IL-6, em macrófagos RAW 264.7, *in vitro* (WU *et al.*, 2014).

Em modelos animais, há estudos que comprovaram a redução do edema de pata induzida pela carragenina em animais tratados com o extrato etanólico das sementes e folhas (SINGH; MISHRA; MISHRA, 2012; UMAMAHESHWARI *et al.*, 2008). Além disso, o extrato etanólico das folhas apresentou efeito antinociceptivo induzida por ácido acético (ação periférica) e por estímulo térmico através do teste da placa quente (ação central) (SINGH; MISHRA; MISHRA, 2012).

Apesar dos estudos prévios sobre a ação da *A. squamosa* na inflamação e dor, os mecanismos de ação pelas quais ela exerce os seus efeitos ainda não foram completamente elucidados. Considerando isso, diferentes modelos experimentais de inflamação e dor foram utilizados neste estudo.

2.5.4 Substâncias isoladas

Distintas partes da *Annona squamosa* (casca, folhas, fruta, semente) são fontes importantes de substâncias com potencial farmacológico, nutracêutica, biológica e fotoquímica (KUMAR *et al.*, 2021). O pericarpo das frutas, por exemplo, possui tanto substâncias essenciais como ácidos graxos, carboidratos, proteínas, vitaminas e minerais, quanto, metabólitos secundários como os terpenos (α -pineno, limoneno, germacreno-D), flavonoide e taninos (BOAKYE *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020; SHEHATA *et al.*, 2021).

Além disso, o extrato aquoso da casca dessa fruta (epicarpo), apresentou como constituinte majoritário o espatulenol (MADHUMITHA *et al.*, 2012).

Uma outra parte da planta com substância previamente isolada e identificada são as folhas. O extrato metanólico das folhas, por exemplo, são ricas em sesquiterpenos, tais como germacreno-D, trans-cariofileno, β -cariofilleno, biciclogermacreno, α -copaeno e humuleno, terpenos (fitol, esqualeno) e cetona (palmitona) (AL-NEMARI *et al.*, 2020). No extrato aquoso e metanólico, entretanto, foi predominante a presença de flavonoides (quercetina-3-O-glucosídeo) (KOTKAR *et al.*, 2002; PANDA; KAR, 2007).

O óleo essencial extraídos das folhas, por sua vez, apresentaram um predomínio de hidrocarbonetos monoterpênicos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e sesquiterpenos oxigenados, sendo o β -cariofileno (23.0%), germacreno D (21.3%), biciclogermacreno (8.5%) e o β -elemeno (7.8%), os compostos majoritários (GARG; GUPTA, 2005). Além disso, a cera cuticular presentes nas folhas, possui palmitona (48%), hidrocarbonetos, aldeídos graxos, álcoois graxos, ácidos graxos e esteróis (SHANKER *et al.*, 2007).

A casca dessa planta, entretanto, possui um predomínio de outros tipos de substâncias, tais como acetogeninas (mosinona A, mosin B e C e annoreticuín-9-ona) (HOPP *et al.*, 1997) e alcaloides (lanuginosina, anomuricina, isocoridina), identificados no extrato etanólico, e sesquiterpenos (óxido de cariofileno), no extrato de éter de petróleo (CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2011).

Considerando que cada parte da planta possui uma função distinta, as sementes da *A. squamosa*, constituída por alcaloides, açúcar redutores, ácidos graxos, compostos fenólicos, taninos, proteínas e aminoácidos, também apresentaram alguns metabólitos secundários distintos aos que foram comentados até o momento (UMAMAHESHWARI *et al.*, 2008). As sementes extraídas com extratores alcoólicos e acetato de etila, por exemplo, tiveram a presença predominante de acetogeninas (esquafosacinas, esquadiolinas, annosquatina, muricina, esquamocinas e esquamoxinona D) e peptídeos cíclico (ciclosquamosina, esquamina A e B) (CHEN *et al.*, 2012; DELLAI *et al.*, 2010; LIAW *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2019; MIAO *et al.*, 2016; YANG *et al.*, 2008).

Os compostos isolados da *A. squamosa*, possuem um grande potencial farmacológico sendo exemplos disso, a sua ação, tanto *in vitro*, como imunoestimulante, anti-inflamatório e anticancerígeno, quanto *in vivo*, como antidiabético, antioxidante, antidepressivo, neuroprotetor, antinociceptivo e anti-inflamatório (AGUILAR-ÁVILA *et al.*, 2019; CHAVAN; WAKTE; SHINDE, 2010; DELLAI *et al.*, 2010; DOS SANTOS *et al.*, 2020; GUO *et al.*, 2014; HOPP *et al.*, 1997; PANDA; KAR, 2007; SONI *et al.*, 2012).

As acetogeninas (esquafosacina, esquadiolinas, esquamocina, esquamoxinona e mosinona), isoladas da *A. squamosa*, por exemplo, têm demonstrado ação citotóxica, *in vitro*, contra diferentes linhagens celulares relacionadas ao câncer mamário (MDA-MB-23, MCF-7), pulmonar (H460, A549 / T), gástrico (BGC 803), pancreático (PACA-2) e hepático (Hep G2, Hep3B, BEL 7402, HepG2, SMMC-7721) (HOPP *et al.*, 1997; LIAW *et al.*, 2008; MA *et al.*, 2019; MIAO *et al.*, 2016).

Entre as substâncias isoladas com ação anti-inflamatória e antinociceptiva, presentes nas folhas, pode-se citar o trans-carifileno (12.12%), fitol (2.22%) e humuleno (1,15 %), extraídos do extrato metanólico, e o β -cariofileno (23.0%) e β -elemeno (7.8%), isolado do óleo essencial da *A. squamosa* (AL-NEMARI *et al.*, 2020; GARG; GUPTA, 2005).

O fitol e o trans-cariofileno, por exemplo, apresentaram efeito antinociceptivo térmico (teste da placa quente) e químico (formalina, ácido acético) em modelos de nocicepção aguda (CARVALHO, Ana Cecília Bezerra *et al.*, 2018; PAULA-FREIRE *et al.*, 2014, p.; SANTOS, Camila Carolina de Menezes Patrício *et al.*, 2013). O β -cariofileno, por sua vez, diminuiu a nocicepção induzida por capsaicina, sendo um dos mecanismos de ação a ativação de receptores canabinoides CB2 periféricos, que estimulam os queratinócitos locais a liberar de β -endorfinas, um opioide endógeno (KATSUYAMA *et al.*, 2013).

Em modelos de dor crônica, o β -cariofileno, reduziu a hiperalgisia mecânica e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-6 e IL-1 β) em modelo de neuropatia diabética crônica induzida por estreptozotocina (AGUILAR-ÁVILA *et al.*, 2019). O trans-cariofileno, por sua vez, diminuiu a hiperalgisia mecânica e nocicepção térmica, em modelo crônico de dor neurogênica (construção do nervo ciático), sendo um dos mecanismos de ação relacionados o sistema opioide e endocanabinoide (PAULA-FREIRE *et al.*, 2014).

Considerando a relação entre a dor e a inflamação, é interesse comentar, também, sobre estudos que comprovam os efeitos anti-inflamatórios dos compostos isolados. O fitol, por exemplo, apresentou ação anti-inflamatório e anti-hiperalgésico através do modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA), onde foi observado a inibição do edema e da atividade da mieloperoxidase (MPO), redução na produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-6) e expressão de COX-2. Além disso, também regulou negativamente as vias de sinalização proteína cinase ativada por mitógeno p38 (p38-MAPK) e NF κ B (CARVALHO *et al.*, 2020).

Estudos *in vitro*, demonstraram que o β -elemene reduziu a produção de mediadores pró-inflamatórios (IL-6, TNF- α , IL-1 β); inibiu a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e potencializou a interleucina-10 (IL-10) em macrófagos murinos (RAW264.7) induzidos por

lipopolissacarídeo (LPS). Além disso, seu efeito anti-inflamatório foi associado a regulação negativa da via de sinalização Wnt/ β -catenina (FANG *et al.*, 2018).

De modo semelhante, o β -cariofileno apresentou ação anti-inflamatória, *in vivo* e *in vitro*, ao inibir a expressão de citocinas pro-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) induzidas por LPS, sendo um dos mecanismos de ação envolvidas com a seu efeito anti-inflamatório, o sistema canabinoide (GERTSCH *et al.*, 2008).

Em modelos animais de inflamação induzida por LPS e carragenina, o α -humuleno diminuiu a produção de citocinas pró inflamatórias (TNF α , IL-1 β) e prostaglandina E2 (PGE2); reduziu a expressão de óxido nítrico sintase (iNOS) e ciclooxigenase (COX-2); inibiu a ativação de NF- κ B e regulou positivamente os receptores B1 de cinina (MEDEIROS *et al.*, 2007).

Utilizando esse mesmo agente flogístico, carragenina, o fitol apresentou efeito antioxidante ao diminuir a concentração de malondialdeído e elevar o de glutathiona, e anti-inflamatório, ao reduzir o edema, a atividade da MPO, TNF- α e IL-1 β (SILVA *et al.*, 2014). Além disso, o fitol também reduziu o edema de pata induzida por histamina, serotonina, bradicinina, composto 48/80 e prostaglandina E2 (SILVA *et al.*, 2014).

Além disso, o β -elemene e o trans-cariofileno, apresentaram ação anti-inflamatória ao inibir o NF- κ B em modelos de carcinogênese cutânea promovida por DMBA/TPA (9,10-dimetil-1,2-benzantraceno/12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato) e neuroinflamação induzida por hipóxia, respectivamente (GUO *et al.*, 2014; HU *et al.*, 2020).

2.6 Alcaloides

Os alcaloides são um grupo consideravelmente variado, tanto estruturalmente, quanto taxonomicamente, detendo como característica unificadora a presença de um nitrogênio básico (EVANS; EVANS, 2009). Esse grupo possui diversas moléculas ativas de origem natural, sendo historicamente utilizados, tanto para fins terapêuticos, quanto na forma de toxinas (HUANG *et al.*, 2007).

A produção de alcaloides está frequentemente associada a mecanismos de autopreservação, inibição de competidores ou comunicação, sendo algumas das fontes de produção bactérias, fungos, plantas e animais (algas, insetos, anfíbios e mamíferos) (CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014; EVANS; EVANS, 2009).

Alguns alcaloides são utilizados rotineiramente pela população na forma de especiarias, como a capsaicina e piperina, ambos presentes na pimenta; como estimulantes

(cafeína) em chá, café e erva-mate e na forma de medicamentos: penicilina, cefalosporina e atropina (DALEY; CORDELL, 2021). Paradoxalmente, eles também podem estar presentes na forma de toxinas e como drogas recreativas (nicotina) e de abuso (morfina, cocaína), que causam grandes impactos na sociedade e sobrecarregam o sistema de saúde (DALEY; CORDELL, 2021).

Considerando os desafios de atender às necessidades globais de doenças, o uso de compostos isolados de plantas, uma abordagem biológica e sustentável, é uma das opções para atender essa necessidade (DALEY; CORDELL, 2021). Considerando isso, este estudo identificou e isolou a palmatina, um alcaloide previamente isolado em algumas plantas medicinais, com diversas atividades biológicas comprovadas.

A palmatina é um sal de amônio quaternário, pertencente a classe protoberberina, sendo classificado como um alcaloide isoquinolínico e como um análogo estrutural da berberina (WANG *et al.*, 2019). Esse alcaloide, palmatina, apresenta um aspecto amarelado e foi isolado previamente em diferentes gêneros botânicos como *Coptis spp.*, *Fibraurea spp.*, *Berberis spp.*, *Phellodendron spp.*, *Corydalis spp.*, *Tinospora spp.* entre outros (ALI; DIXIT, 2013; DENG; ZHANG; LUO, 2012; FRANCESCHIN *et al.*, 2018; ONG; KIM, 2014; TARABASZ; KUKULA-KOCH, 2020; THAKUR *et al.*, 2016; XIAO *et al.*, 2015).

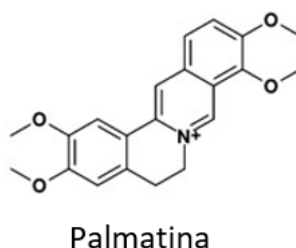


Figura 1- Estrutura química da Palmatina

2.6.1 Farmacocinética da palmatina

Estudos pré-clínicos sobre a farmacocinética da palmatina vem sendo cada vez mais estudada. A administração oral (300mg cápsula) e intramuscular (2mg/kg) da palmatina em cães, demonstraram, que, a via intramuscular possui uma absorção rápida, atingindo o pico plasmático de 334 ng/ml, 12 minutos após a administração, e uma meia vida plasmática de 49h. A via oral, entretanto, apresentou uma absorção mais lenta, atingindo um pico plasmático de 8 ng/ml, 5 horas após a administração, e possui uma meia vida plasmática de 56 horas (HUANG *et al.*, 2007). Além disso, a palmatina possuiu boa distribuição sobre vários tecidos,

sofre metabolização hepática mediada pelo citocromo p450, o que pode influenciar no metabolismo e outras drogas e causar efeitos tóxicos, e é eliminada pela bile, urina e fezes (TARABASZ; KUKULA-KOCH, 2020).

2.6.2 Atividades biológicas da palmatina

A palmatina está presente em muitas plantas medicinais, razão pela qual vem se prestando cada vez mais atenção aos seus efeitos farmacológicos, incluído a sua ação neuroprotetora, anticâncer, antibacteriana, antiviral, antioxidante, anti-inflamatória e como hipolipemiante no sangue (MA *et al.*, 2016; OKECHUKWU *et al.*, 2021; TANG *et al.*, 2021; ZHOU *et al.*, 2017).

A inibição do estresse oxidativo desempenha um papel importante na resolução de diversos tipos de doenças e infecções. Considerando isso, muitos estudos vêm relacionando a contribuição, em parte, da ação antioxidante da palmatina em alguns modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* (CHAVES *et al.*, 2020).

Em um modelo de ratos diabéticos induzido por estreptozotocina, por exemplo, a palmatina regulou negativamente a expressão das proteínas chaperonas, CALR (Proteína calreticulina) e GRP78 (Proteína Reguladora de Glicose 78), e regulou positivamente a expressão de proteínas antioxidantes responsáveis pela proteção das células contra espécies reativas de oxigênio e estresse endoplasmático: peroxidoxina 4, proteína dissulfeto isomerase, Glutathione-S-Transferase e albumina sérica (OKECHUKWU *et al.*, 2021).

Em um modelo de lesão de isquemia-reperfusão no miocárdio, a palmatina apresentou ação cardioprotetora, ao reduzir a expressão da COX-2 e iNOS, e antioxidante, ao inibir a atividade enzimática dos antioxidantes do superóxido de dismutase, catalase e malonaldeído (KIM *et al.*, 2009). Além disso, a palmatina também possui efeito gastroprotetor, contra úlceras gástricas, ao estimular a produção de PGE₂ (WANG *et al.*, 2017) e neuroprotetor, através da inibição da formação da placa β -amiloide (Haj *et al.*, 2018).

Entre os outros mecanismos de neuroproteção relacionados a palmatina, pode-se citar a inibição da acetilcolinesterase, uma enzima com papel importante no desenvolvimento de distúrbios neurológicos como doença de Alzheimer, demência senil e ataxia (CHAVES *et al.*, 2020; MUKHERJEE *et al.*, 2007). Além disso, na lesão de isquemia-reperfusão cerebral em camundongos, a palmatina apresentou ação neuroprotetora através da diminuição do estresse oxidativo, da inflamação e da apoptose, mediada pela via da proteína quinase ativada por AMP (AMPK)/fator nuclear relacionado ao fator E2 (Nrf2) (TANG *et al.*, 2021).

O acúmulo lipídios no sangue, associado ou não ao estresse oxidativo, propiciam o desenvolvimento de diversas doenças. Considerando isso, estudos vêm comprovando a ação da palmatina como hipolipemiante. Em modelos animais com dieta de alto teor lipídico, a palmatina preveniu o aumento de peso corporal; diminuiu os níveis séricos do colesterol total e triglicerídeos; elevou a lipoproteína de baixa densidade e aumentou a excreção fecal de colesterol total e ácidos biliares totais (HE, Kai *et al.*, 2016; NING *et al.*, 2015)

Entre os mecanismos pelas quais ela exerce essa regulação lipídica, há estudos que relacionam a palmatina com a regulação positiva do receptor de lipoproteína de baixa densidade, do mRNA do colesterol 7 α -hidroxilase (CYP7A1) e da proteína desacopladora 2 (UCP2), enquanto a regulação negativa do transportador apical de sal biliar dependente de sódio (ASBT) e do mRNA do 3- hidróxi-3-metilglutaril-Coenzima A (HMG-CoA), são responsáveis por retardar a síntese de colesterol (HE, Kai *et al.*, 2016; NING *et al.*, 2015).

Além desses efeitos protetores, vale ressaltar, também, a vasta gama de ação da palmatina como antiviral, antibacteriana, antifúngica (*Microsporium canis*) e citotóxico contra células cancerígenas (XIAO *et al.*, 2015). Sendo alguns exemplos disso o seu efeito antiviral contra o vírus Zika (ZIKV), H1N1, H5N1, vírus da encefalite japonesa (JEV), dengue (DENV-2), febre amarela e a febre do Nilo Ocidental (JIA *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017).

Entre os mecanismos de ação relacionados com o seu efeito antiviral, pode-se citar a inibição da neuraminidase, no vírus H1N1; inibição da protease NS2B-NS3, no vírus da dengue, e a ligação direta da palmatina com a proteína do envelope do ZIKV, que impede a entrada do vírus e prejudica a sua estabilidade (HO *et al.*, 2019; KIM *et al.*, 2014).

A palmatina também possui uma considerável ação antibacteriana, *in vitro*, contra gram-positiva (*Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Clostridium perfringens* *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus lysodeikticus*) e gram-negativa (*Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella typhi*) (DENG; ZHANG; LUO, 2012; KIM *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017). Além, disso, ela foi capaz de inibir a urease e neuraminidase da *Helicobacter pylori* e *Clostridium perfringens*, respectivamente (KIM *et al.*, 2014; ZHOU *et al.*, 2017).

Quanto ao efeito citotóxico da palmatina, há estudos que comprovam a sua ação, *in vitro*, contra diversas linhagens celulares humanas relacionadas com o câncer de próstata (LNCaP, PC-3 e DU145); cólon (HT-29); pâncreas (MIA PaCa-2 e PANC-1); hepatoma (7701QGY, SMMC7721, HepG2); leucemia linfoblástica aguda (CEM) e carcinoma escamoso oral (KB) (BALA *et al.*, 2015; CHAKRAVARTHY *et al.*, 2018; HAMBRIGHT *et*

al., 2015; ZHANG, Lei *et al.*, 2012). Em modelos animais, por sua vez, há estudos que relatam a sua ação contra a carcinogênese cutânea induzida por DMBA e câncer de próstata (ALI; DIXIT, 2013; HAMBRIGHT *et al.*, 2015).

Levando isso em consideração, o mecanismo e ação pela qual a palmatina exerce seu efeito anticancerígeno, vem sendo estudada. Em um estudo sobre o câncer de próstata, por exemplo, a palmatina foi relacionada com as proteínas ribossomais S6, a inibição do NF- κ B e de seu gene alvo o c-FLIP (Proteína inibidora semelhante a c-FLICE) (HAMBRIGHT *et al.*, 2015). No câncer de cólon, por sua vez, o seu efeito foi associado com a diminuição na produção de espécies reativas de oxigênio intracelular; diminuição do potencial de membrana mitocondrial e super expressão da aurora quinase A (AURKA) (HAMBRIGHT *et al.*, 2015; LIU *et al.*, 2020). Sendo necessário ressaltar, também, os riscos associados a palmatina: a toxicidade significativa da palmatina sobre o DNA (LONG *et al.*, 2019).

2.6.2 Mecanismos de ação na dor e inflamação da palmatina

A palmatina apresentou efeito anti-inflamatório *in vitro* (células endoteliais de cabra estimuladas por LPS), ao reduzir a produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- α , IL-1 β , IL-6 e NO, e aumentar a produção de substância anti-inflamatória, como a IL-10 PGE₂ (YAN *et al.*, 2017). Um dos mecanismos pelas quais isso ocorre pode estar relacionado com a inibição das vias de sinalização dependentes do TRIF e NF- κ B ao nível dos genes (YAN *et al.*, 2017).

Além disso, a palmatina apresentou efeito condroprotetor *in vitro* (condrócitos de coelhos) e *in vivo* (osteoartrite em coelho) induzida por IL-1 β , na qual foi possível observar a redução na produção de metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-3 e MMP-13), a melhora na expressão de inibidores teciduais das MMPs (TIMP-1) e a inibição das vias de sinalização Hedgehog e Wnt/beta-catenina (ZHOU *et al.*, 2016).

A palmatina também diminuiu a fosforilação da via ERK1/2, que, por sua vez, contribuiu para a redução na expressão do P2X7, um receptor com papel importante no desenvolvimento da dor e depressão, e diminuiu os níveis de TNF- α e IL-1 β , presentes no hipocampo de ratos com neuropatia diabética e depressão (SHEN *et al.*, 2018).

A administração diária de palmatina por 14 dias, apresentou ação anti-hiperalgesica em um modelo de constrição crônica do nervo infraorbital (neuralgia do trigêmeo) em ratos, sendo um dos possíveis mecanismos de ação a regulação da expressão do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, um neurotransmissor com papel importante na transmissão

dor, e seus receptores, presentes no gânglio trigeminal, ao inibir a fosforilação da proteína quinase C (PKC) e suprimir a liberação de IL-1 β e TNF- α (HE, L. *et al.*, 2020).

2.7 Modelos animais de inflamação e dor

Os modelos animais possuem um papel importante na elucidação e na melhor compreensão de diversos processos farmacológicos, como também, na determinação da eficácia e segurança de novas substâncias com potenciais terapêuticos (MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016).

Sendo alguns exemplos disso, a pleurisia induzida por carragenina, um polissacarídeo sulfatado, que induz a inflamação aguda na cavidade pleural e permite a avaliação dos seguintes parâmetros inflamatórios: extravasamento de fluido, migração leucocitária (principalmente neutrófilos) e parâmetros bioquímicos (PATIL *et al.*, 2019). Além disso, a aplicação de carragenina na pata do animal induz a inflamação local, provocando edema e hiperalgesia através da ação da COX-2 e da ativação do receptor Toll-like 4 (TLR4), que estimulam a produção de prostanoídes e citocinas pró-inflamatórias, respectivamente (CORSINI *et al.*, 2005; MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016; NANTEL *et al.*, 1999).

O teste de formalina, por sua vez, é um modelo de dor inflamatória aguda que avalia os mecanismos periféricos e centrais da dor, através da observação da resposta nociceptiva do animal (tempo em que o animal lambe ou morde a pata), durante as duas fases do teste (HAN *et al.*, 2013; MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016).

A primeira fase, neurogênica, envolve a estimulação direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase (inflamatória), envolve a produção de mediadores pró-inflamatórios (YIN *et al.*, 2016). Além disso, estudos anteriores sobre o teste de formalina, relataram que a ativação do receptor TRPA1, nos neurônios sensoriais aferentes primários (MCNAMARA *et al.*, 2007); a síntese de prostaglandinas pela COX-2 (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 2002) e a ação da IL-33 (HAN *et al.*, 2013), que possuem um papel importante na transmissão da dor.

Além disso, como a percepção da dor entre animais e humanos são diferentes, a presença da dor em animais é analisada através da manifestação do comportamento nociceptivo (teste de formalina) e dos reflexos de retirada a estímulos mecânico (teste de Von frey) ou térmicos (teste da acetona) (RUAN *et al.*, 2018).

O teste de cetona, por exemplo, avalia o alodinia ao frio, através do contato com a acetona, que, ao evaporar, esfria a pata do animal e promove o comportamento de alodinia:

sacude a pata (BRENNER; GOLDEN; GEREAU, 2012; KARASHIMA *et al.*, 2009; RUAN *et al.*, 2018). O teste de Von frey, por sua vez, avalia a mecanossensibilidade, através da estimulação tátil dos filamentos de Von frey na superfície plantar do animal (MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016).

3. OBJETIVOS

GERAIS

Avaliar a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, anti-hiperalgésica do extrato metanólico da *Annona squamosa* (EMAS), obtido das folhas, e do seu composto isolado, a palmatina.

ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato metanólico da *Annona squamosa* (EMAS) e da palmatina através da pleurisia induzida por carragenina.
- Analisar o efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgésico (mecânico e sensibilidade ao frio), do EMAS e da palmatina, através da indução da inflamação articular induzida por zymosan.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do EMAS e da palmatina na primeira fase (dor neurogênica) e segunda fase (dor inflamatória) da nocicepção induzida por formalina.
- Analisar a ação anti-hiperalgésica da palmatina através da injeção intraplantar de TNF.
- Observar a viabilidade leucocitária do EMAS e da palmatina, *in vitro*, através do teste do MTT, brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium].

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, R.; OHTANI, K. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 2, p. 554–565, 2013.

AGUILAR-ÁVILA, D.S.; FLORES-SOTO, M.E.; TAPIA-VÁZQUEZ, C.; PASTOR-ZARANDONA, O.A.; LÓPEZ-ROA, R.I.; VIVEROS-PAREDES, J.M. β -Caryophyllene, a Natural Sesquiterpene, Attenuates Neuropathic Pain and Depressive-Like Behavior in Experimental Diabetic Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 22, n. 5, p. 460–468, 2019.

AL-HASANI, R.; BRUCHAS, M. R. Molecular Mechanisms of Opioid Receptor-Dependent Signaling and Behavior. **Anesthesiology**, v. 115, n. 6, p. 1363–1381, 2011.

ALI, H.; DIXIT, S. Extraction optimization of *Tinospora cordifolia* and assessment of the anticancer activity of its alkaloid palmatine. **TheScientificWorldJournal**, v. 2013, 2013.

AL-NEMARI, R.; AL-SENAIDY, A.; SEMLALI, A.; ISMAEL, M.; BADJAH-HADJ-AHMED, A.Y.; BEN BACHA, A. GC-MS profiling and assessment of antioxidant, antibacterial, and anticancer properties of extracts of *Annona squamosa* L. leaves. **BMC Complementary Medicine and Therapies**, v. 20, n. 1, p. 296, 2020.

ANAYA-ESPARZA, L.M.; GARCÍA-MAGAÑA, M. DE L.; ABRAHAM DOMÍNGUEZ-ÁVILA, J.; YAHIA, E.M.; SALAZAR-LÓPEZ, N.J.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G.A.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Annonas: Underutilized species as a potential source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 138, p. 109775, 2020.

ARNOLD, W.R.; CARNEVALE, L.N.; XIE, Z.; BAYLON, J.L.; TAJKHORSHID, E.; HU, H.; DAS, A. Anti-inflammatory dopamine- and serotonin-based endocannabinoid epoxides reciprocally regulate cannabinoid receptors and the TRPV1 channel. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 926, 2021.

ARTHUR, J.; BRUERA, E. Balancing opioid analgesia with the risk of nonmedical opioid use in patients with cancer. **Nature Reviews. Clinical Oncology**, v. 16, n. 4, p. 213–226, abr. 2019.

ATKINSON, T. J.; FUDIN, J. Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs for Acute and Chronic Pain. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 31, n. 2, p. 219–231, 2020.

ATTIQ, A.; JALIL, J.; HUSAIN, K. Annonaceae: Breaking the Wall of Inflammation. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, p. 752, 2017.

BALA, M.; PRATAP, K.; VERMA, P.K.; SINGH, B.; PADWAD, Y. Validation of ethnomedicinal potential of *Tinospora cordifolia* for anticancer and immunomodulatory activities and quantification of bioactive molecules by HPTLC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 175, p. 131–137, 2015.

BARAL, P.; UDIT, S.; CHIU, I. M. Pain and immunity: implications for host defence. **Nature Reviews Immunology**, v. 19, n. 7, p. 433–447, 2019.

BARNES, P. J.; ADCOCK, I. M. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. **Lancet (London, England)**, v. 373, n. 9678, p. 1905–1917, 2009.

BEKASSY, Z.; LOPATKO FAGERSTRÖM, I.; BADER, M.; KARPMAN, D. Crosstalk between the renin–angiotensin, complement and kallikrein–kinin systems in inflammation. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–18, 2021.

BERTIN, C.; DELAGE, N.; ROLLAND, B.; PENNEL, L.; FATSEAS, M.; TROUVIN, A.-P.; DELORME, J.; CHENAF, C.; AUTHIER, N. Analgesic opioid use disorders in patients with chronic non-cancer pain: A holistic approach for tailored management. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 121, p. 160–174. 2021.

BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical Pharmacology**, v. 180, 2020.

BOAKYE, A.; WIREKO-MANU, F.; AGBENORHEVI, J.; ODURO, I. Antioxidant activity, total phenols and phytochemical constituents of four underutilised tropical fruits. **International Food Research Journal**, v. 22, p. 262–268, 2015.

BRÆNNE, I.; WILLENBORG, C.; TRAGANTE, V.; KESSLER, T.; ZENG, L.; REIZ, B.; KLEINECKE, M.; VON AMELN, S.; WILLER, C.J.; LAAKSO, M.; WILD, P.S.; ZELLER, T.; WALLENTIN, L.; FRANKS, P.W.; SALOMAA, V.; DEHGHAN, A.; MEITINGER, T.; SAMANI, N.J.; ASSELBERGS, F.W.; ERDMANN, J.; SCHUNKERT, H. A genomic exploration identifies mechanisms that may explain adverse cardiovascular effects of COX-2 inhibitors. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº 24, de 14 de junho de 2011. 2011. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2011/rdc0024_14_06_2011.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da diretoria colegiada - RDC Nº26, de 13 de maio de 2014. 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf.

BRASIL (Org.). **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. 1a. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, 2006(Série B-Textos básicos de saúde).

BRASIL. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Mediciniais de Interesse ao SUS. 2009. Disponível em: <https://repositorio.observatoriodocuidado.org/handle/handle/2129>.

BRENNAN, E.; KANTHARIDIS, P.; COOPER, M.E.; GODSON, C. Pro-resolving lipid mediators: regulators of inflammation, metabolism and kidney function. **Nature Reviews. Nephrology**, v. 17, n. 11, p. 725–739, 2021.

BRENNER, D. S.; GOLDEN, J. P.; GEREAU, R. W. A Novel Behavioral Assay for Measuring Cold Sensation in Mice. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e39765, 2012.

BUCZYNSKI, M.W.; SVENSSON, C.I.; DUMLAO, D.S.; FITZSIMMONS, B.L.; SHIM, J.-H.; SCHERBART, T.J.; JACOBSEN, F.E.; HUA, X.-Y.; YAKSH, T.L.; DENNIS, E.A. Inflammatory hyperalgesia induces essential bioactive lipid production in the spinal cord. **Journal of neurochemistry**, v. 114, n. 4, p. 981–993, 2010.

CANNON, C. P.; CANNON, P. J. COX-2 Inhibitors and Cardiovascular Risk. **Science**, v. 336, n. 6087, 2012.

CARVALHO, A.C.B.; LANA, T.N.; PERFEITO, J.P.S.; SILVEIRA, D. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29–35, 2018.

CARVALHO, A.M.S.; HEIMFARTH, L.; PEREIRA, E.W.M.; OLIVEIRA, F.S.; MENEZES, I.R.A.; COUTINHO, H.D.M.; PICOT, L.; ANTONIOLLI, A.R.; QUINTANS, J.S.S.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Phytol, a Chlorophyll Component, Produces Antihyperalgesic, Anti-inflammatory, and Antiarthritic Effects: Possible NFκB Pathway Involvement and

Reduced Levels of the Proinflammatory Cytokines TNF- α and IL-6. **Journal of Natural Products**, v. 83, n. 4, p. 1107–1117, 2020.

CHAKRAVARTHY, D.; MUÑOZ, A.R.; SU, A.; HWANG, R.F.; KEPPLER, B.R.; CHAN, D.E.; HALFF, G.; GHOSH, R.; KUMAR, A.P. Palmatine suppresses glutamine-mediated interaction between pancreatic cancer and stellate cells through simultaneous inhibition of survivin and COL1A1. **Cancer letters**, v. 419, p. 103–115, 2018.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of 18-acetoxy-ent-kaur-16-ene from *Annona squamosa* L. bark. **Inflammopharmacology**, v. 19, n. 2, p. 111–115, 2011.

CHAVAN, M. J.; WAKTE, P. S.; SHINDE, D. B. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 17, n. 2, p. 149–151, 2010.

CHAVES, S.K.M.; AFZAL, M.I.; ISLAM, M.T.; HAMEED, A.; DA MATA, A.M.O.F.; DA SILVA ARAÚJO, L.; ALI, S.W.; ROLIM, H.M.L.; DE MEDEIROS, M. DAS G.F.; COSTA, E.V.; SALEHI, B.; MARTINS, N.; ARIF, A.M.; IMRAN, M.; SHARIFI-RAD, J.; MELO-CAVALCANTE, A.A. DE C.; FEITOSA, C.M. Palmatine antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities: A pre-clinical assessment. **Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)**, v. 66, n. 4, p. 54–59, 2020.

CHELLAPPAN, D.K.; KUPPUSAMY, R.; LOBO, R.; SHIRWAIKAR, A. An identity based pharmacognostical profile of folium *Annona squamosa*. **Natural Product Sciences**, v. 11, p. 213–219, 2005.

CHEN, L.; LV, F.; PEI, L. Annexin 1: A glucocorticoid-inducible protein that modulates inflammatory pain. **European Journal of Pain**, v. 18, n. 3, p. 338–347, 2014.

CHEN, Y.; XU, S.; CHEN, J.; WANG, Y.; XU, H.; FAN, N.; LI, X. Anti-tumor activity of *Annona squamosa* seeds extract containing annonaceous acetogenin compounds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 2, p. 462–466, 2012.

CHEN, Y., CHEN, Y., SHI, Y.; MA, C.; WANG, X.; LI, Y.; MIAO, Y.; CHEN, J.; LI, X. Antitumor activity of *Annona squamosa* seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 193, p. 362–367, 2016.

CHEN, Y.-Y.; LI, F.-Q.; ZHU, X.-L.; CHEN, J.-W.; LI, X. Chemical composition and anti-hepatoma effect of *Annona squamosa* L. pericarp oil. **Natural Product Research**, p. 1–4, 2020.

CHINNASAMY, P.; ARUMUGAM, R.; ARIYAN, S. In silico validation of the indigenous knowledge of the herbal medicines among tribal communities in Sathyamangalam wildlife sanctuary, India. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 9, n. 2, p. 143–155, 2019.

CHIURCHIÙ, V.; LEUTI, A.; MACCARRONE, M. Bioactive Lipids and Chronic Inflammation: Managing the Fire Within. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 38, 2018.

- CLAYTON, S.A.; JONES, S.W.; KUROWSKA-STOLARSKA, M.; CLARK, A.R. The role of microRNAs in glucocorticoid action. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 293, n. 6, p. 1865–1874, 2018.
- COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. **The Lancet**, v. 397, n. 10289, p. 2082–2097, 2021.
- CORDER, G.; CASTRO, D.C.; BRUCHAS, M.R.; SCHERRER, G. Endogenous and Exogenous Opioids in Pain. **Annual review of neuroscience**, v. 41, p. 453–473, 2018.
- CORSINI, E.; DI PAOLA, R.; VIVIANI, B.; GENOVESE, T.; MAZZON, E.; LUCCHI, L.; MARINOVICH, M.; GALLI, C.L.; CUZZOCREA, S. Increased carrageenan-induced acute lung inflammation in old rats. **Immunology**, v. 115, n. 2, p. 253–261, 2005.
- CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, 2014.
- DALEY, S.; CORDELL, G. A. Alkaloids in Contemporary Drug Discovery to Meet Global Disease Needs. **Molecules**, v. 26, n. 13, 2021.
- DELLAI, A.; MARICIC, I.; KUMAR, V.; ARUTYUNYAN, S.; BOURAOUI, A.; NEFZI, A. Parallel synthesis and anti-inflammatory activity of cyclic peptides cyclosquamosin D and Met-cherimolacyclopeptide B and their analogs. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, n. 19, p. 5653–5657, 2010.
- DENG, Y.; ZHANG, M.; LUO, H. Identification and antimicrobial activity of two alkaloids from traditional Chinese medicinal plant *Tinospora capillipes*. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 298–302, 2012.
- DOS SANTOS, E.; RADAI, J.A.S.; DO NASCIMENTO, K.F.; FORMAGIO, A.S.N.; DE MATOS BALSALOBRE, N.; ZIFF, E.B.; CASTELON KONKIEWITZ, E.; KASSUYA, C.A.L. Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of *Psidium guineense*. **Nutritional Neuroscience**, p. 1–11, 2020.
- EVANS, W. C.; EVANS, D. Chapter 26 - Alkaloids. In: EVANS, W. C.; EVANS, D. (org.). **Trease and Evans' Pharmacognosy (Sixteenth Edition)**. W.B. Saunders, 2009. p. 353–415. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702029332000265>.
- FANG, Y.; KANG, Y.; ZOU, H.; CHENG, X.; XIE, T.; SHI, L.; ZHANG, H. β -elemene attenuates macrophage activation and proinflammatory factor production via crosstalk with Wnt/ β -catenin signaling pathway. **Fitoterapia**, v. 124, p. 92–102, 2018.
- FAOUZI, A.; VARGA, B. R.; MAJUMDAR, S. Biased Opioid Ligands. **Molecules**, v. 25, n. 18, 2020.
- FRANCESCHIN, M.; CIANNI, L.; PITORRI, M.; MICHELI, E.; CACCHIONE, S.; FREZZA, C.; SERAFINI, M.; HU, M.-H.; SU, H.; HUANG, Z.; GU, L.; BIANCO, A. Natural Aromatic Compounds as Scaffolds to Develop Selective G-Quadruplex Ligands:

From Previously Reported Berberine Derivatives to New Palmatine Analogues. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 23, n. 6, 2018.

FRANK-CANNON, T.C.; ALTO, L.T.; MCALPINE, F.E.; TANSEY, M.G. Does neuroinflammation fan the flame in neurodegenerative diseases? **Molecular Neurodegeneration**, v. 4, n. 1, p. 47, 2009.

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8, p. 551–567, ago. 2016.

FURMAN, D.; CAMPISI, J.; VERDIN, E.; CARRERA-BASTOS, P.; TARG, S.; FRANCESCHI, C.; FERRUCCI, L.; GILROY, D.W.; FASANO, A.; MILLER, G.W.; MILLER, A.H.; MANTOVANI, A.; WEYAND, C.M.; BARZILAI, N.; GORONZY, J.J.; RANDO, T.A.; EFFROS, R.B.; LUCIA, A.; KLEINSTREUER, N.; SLAVICH, G.M. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. **Nature Medicine**, v. 25, n. 12, p. 1822–1832, 2019.

GAESTEL, M.; KOTLYAROV, A.; KRACHT, M. Targeting innate immunity protein kinase signalling in inflammation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 8, n. 6, p. 480–499, 2009.

GARG, S. N.; GUPTA, D. Composition of the Leaf Oil of *Annona squamosa* L. from the North Indian Plains. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 3, p. 257–258, 2005.

GERTSCH, J.; LEONTI, M.; RADUNER, S.; RACZ, I.; CHEN, J.-Z.; XIE, X.-Q.; ALTMANN, K.-H.; KARSAK, M.; ZIMMER, A. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 26, p. 9099–9104, 2008.

GONÇALVES, K. G.; PASA, M. C. The ethnobotany and medicinal plants in Community Sucuri, Cuiabá, MT, Brazil. **Interações (Campo Grande)**, v. 16, p. 245–256, 2015.

GROVER, P.; SINGH, S.P.; PRABHAKAR, P.V.; REDDY, U.A.; BALASUBRAMANYAM, A.; MAHBOOB, M.; RAHMAN, M.F.; MISRA, S. In vivo assessment of genotoxic effects of *Annona squamosa* seed extract in rats. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 8, p. 1964–1971, 2009.

GUO, K.; MOU, X.; HUANG, J.; XIONG, N., LI, H. Trans-caryophyllene suppresses hypoxia-induced neuroinflammatory responses by inhibiting NF- κ B activation in microglia. **Journal of molecular neuroscience: MN**, v. 54, n. 1, p. 41–48, 2014.

GUPTA, R.K.; KESARI, A.N.; MURTHY, P.S.; CHANDRA, R.; TANDON, V.; WATAL, G. Hypoglycemic and antidiabetic effect of ethanolic extract of leaves of *Annona squamosa* L. in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 75–81, 2005.

GUPTA, R.K.; KESARI, A.N.; DIWAKAR, S.; TYAGI, A.; TANDON, V.; CHANDRA, R.; WATAL, G. In vivo evaluation of anti-oxidant and anti-lipidimic potential of *Annona squamosa* aqueous extract in Type 2 diabetic models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, n. 1, p. 21–25, 2008.

HAI, E.; LOSEV, Y.; GURU KRISHNAKUMAR, V.; PICHINUK, E.; ENGEL, H.; RAVEH, A.; GAZIT, E.; SEGAL, D. Integrating in vitro and in silico approaches to evaluate the “dual functionality” of palmatine chloride in inhibiting and disassembling Tau-derived VQIVYK peptide fibrils. **Biochimica et Biophysica acta. General Subjects**, v. 1862, n. 7, p. 1565–1575, 2018.

HAMBRIGHT, H.G.; BATTH, I.S.; XIE, J.; GHOSH, R.; KUMAR, A.P. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for rpS6/NFκB/FLIP. **Molecular Carcinogenesis**, v. 54, n. 10, p. 1227–1234, 2015.

HAN, P.; ZHAO, J.; LIU, S.-B.; YANG, C.-J.; WANG, Y.-Q.; WU, G.-C.; XU, D.-M.; MI, W.-L. Interleukin-33 mediates formalin-induced inflammatory pain in mice. **Neuroscience**, v. 241, p. 59–66, 25, 2013.

HE, K.; KOU, S.; ZOU, Z.; HU, Y.; FENG, M.; HAN, B.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic Effects of Alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters. **Planta Medica**, v. 82, n. 8, p. 690–697, 2016.

HE, K.; KOU, S.; ZOU, Z.; HU, Y.; FENG, M.; HAN, B.; LI, X.; YE, X. Palmatine alleviates hyperalgesia by inhibiting the expression of calcitonin gene-related peptide in the trigeminal ganglion of rats with chronic constriction injury of the infraorbital nerve. **The British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 58, n. 4, p. 443–450, 2020.

HO, Y.-J.; LU, J.-W.; HUANG, Y.-L.; LAI, Z.-Z. Palmatine inhibits Zika virus infection by disrupting virus binding, entry, and stability. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 518, n. 4, p. 732–738, 2019.

HOES, J.N.; JACOBS, J.W.G.; BUTTGEREIT, F.; BIJLSMA, J.W.J. Current view of glucocorticoid co-therapy with DMARDs in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 6, n. 12, p. 693–702, 2010.

HOPP, D.C.; ZENG, L.; GU, Z.M.; KOZLOWSKI, J.F.; MCLAUGHLIN, J.L. Novel monotetrahydrofuran ring acetogenins, from the bark of *Annona squamosa*, showing cytotoxic selectivities for the human pancreatic carcinoma cell line, PACA-2. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 6, p. 581–586, 1997.

HU, X.; WANG, L.; ZHANG, L.; ZHANG, T. β-Elemene inhibits 7,12-dimethylbenz(a)anthracene/12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced skin tumorigenesis through suppression of NF-κB-associated signaling events in the mouse skin model. **Journal of Biochemical and Molecular Toxicology**, v. 34, n. 10, 2020.

HUANG, J.; WANG, G.; JIN, Y.; SHEN, T.; WENG, W. Determination of palmatine in canine plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry with solid-phase extraction. **Journal of Chromatography. B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences**, v. 854, n. 1–2, p. 279–285, 2007.

JIA, F.; ZOU, G.; FAN, J.; YUAN, Z. Identification of palmatine as an inhibitor of West Nile virus. **Archives of Virology**, v. 155, n. 8, p. 1325–1329, 2010.

JOOSTEN, L.A.B.; ABDOLLAHI-ROODSAZ, S.; DINARELLO, C.A.; O'NEILL, L.; NETEA, M.G. Toll-like receptors and chronic inflammation in rheumatic diseases: new developments. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 12, n. 6, p. 344–357, 2016.

JU, Z., LI, M.; XU, J.; HOWELL, D.C.; LI, Z.; CHEN, F.-E. Recent development on COX-2 inhibitors as promising anti-inflammatory agents: The past 10 years. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, 2022.

KALIDINDI, N.; THIMMAIAH, N.V.; JAGADEESH, N.V.; NANDEEP, R.; SWETHA, S.; KALIDINDI, B. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. leaves. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 4, p. 795–802, 2015.

KARASHIMA, Y.; TALAVERA, K.; EVERAERTS, W.; JANSSENS, A.; KWAN, K.Y.; VENNEKENS, R.; NILIUS, B.; VOETS, T. TRPA1 acts as a cold sensor in vitro and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 4, p. 1273–1278, 2009.

KATSUYAMA, S.; MIZOGUCHI, H.; KUWAHATA, H.; KOMATSU, T.; NAGAOKA, K.; NAKAMURA, H.; BAGETTA, G.; SAKURADA, T.; SAKURADA, S. Involvement of peripheral cannabinoid and opioid receptors in β -caryophyllene-induced antinociception. **European Journal of Pain (London, England)**, v. 17, n. 5, p. 664–675, 2013.

KIILL, L. H. P.; COSTA, J. G. da. Biologia floral e sistema de reprodução de *Annona squamosa* L. (Annonaceae) na região de Petrolina-PE. **Ciência Rural**, v. 33, n. 5, p. 851–856, 2003.

KIM, J.; YANG, G.S.; LYON, D.; KELLY, D.L.; STECHMILLER, J. Metabolomics: Impact of Comorbidities and Inflammation on Sickness Behaviors for Individuals with Chronic Wounds. **Advances in Wound Care**, v. 10, n. 7, p. 357–369, 2021.

KIM, J.H.; RYU, Y.B.; LEE, W.S.; KIM, Y.H. Neuraminidase inhibitory activities of quaternary isoquinoline alkaloids from *Corydalis turtschaninovii* rhizome. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6047–6052, 2014.

KIM, S.W.; RHEE, H.J.; KO, J.; KIM, Y.J.; KIM, H.G.; YANG, J.M.; CHOI, E.C.; NA, D.S. Inhibition of cytosolic phospholipase A2 by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, n. 19, p. 15712–15719, 2001.

KIM, Y.M.; HA, Y.M.; JIN, Y.C.; SHI, L.Y.; LEE, Y.S.; KIM, H.J.; SEO, H.G.; CHOI, J.S.; KIM, Y.S.; KANG, S.S.; LEE, J.H.; CHANG, K.C. Palmatine from *Coptidis rhizoma* reduces ischemia-reperfusion-mediated acute myocardial injury in the rat. **Food and Chemical Toxicology: An International Journal Published for the British Industrial Biological Research Association**, v. 47, n. 8, p. 2097–2102, 2009.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, inflammation, and disease susceptibility. **Cell**, v. 160, n. 5, p. 816–827, 2015.

KOTKAR, H.M.; MENDKI, P.S.; SADAN, S.V.G.S.; JHA, S.R.; UPASANI, S.M.; MAHESHWARI, V.L. Antimicrobial and pesticidal activity of partially purified flavonoids of *Annona squamosa*. **Pest Management Science**, v. 58, n. 1, p. 33–37, 2002.

KUMAR, M.; TOMAR, M.; AMAROWICZ, R.; SAURABH, V.; NAIR, M.S.; MAHESHWARI, C.; SASI, M.; PRAJAPATI, U.; HASAN, M., SINGH, S.; CHANGAN, S.; PRAJAPAT, R.K.; BERWAL, M.K.; SATANKAR, V. Guava (*Psidium guajava* L.) Leaves: Nutritional Composition, Phytochemical Profile, and Health-Promoting Bioactivities. **Foods**, v. 10, n. 4, 1 abr. 2021.

LEE, S.-Y.; CHO, S.-S.; LI, Y.; BAE, C.-S.; PARK, K.M.; PARK, D.-H. Anti-inflammatory Effect of *Curcuma longa* and *Allium hookeri* Co-treatment via NF- κ B and COX-2 Pathways. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 5718, 31 mar. 2020.

LI, D.; XING, F. Ethnobotanical study on medicinal plants used by local Hoklos people on Hainan Island, China. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 358–368, 2016.

LI, P.; CHANG, M. Roles of PRR-Mediated Signaling Pathways in the Regulation of Oxidative Stress and Inflammatory Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 14, 2021.

LIAW, C.-C.; YANG, Y.-L.; CHEN, M.; CHANG, F.-R.; CHEN, S.-L.; WU, S.-H.; WU, Y.-C. Mono-tetrahydrofuran annonaceous acetogenins from *Annona squamosa* as cytotoxic agents and calcium ion chelators. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 5, p. 764–771, 2008.

LIU, X.; ZHANG, Y.; WU, S.; XU, M.; SHEN, Y.; YU, M.; FAN, J.; WEI, S.; XU, C.; HUANG, L.; ZHAO, H.; LI, X.; YE, X. Palmatine induces G2/M phase arrest and mitochondrial-associated pathway apoptosis in colon cancer cells by targeting AURKA. **Biochemical pharmacology**, v. 175, 2020.

LONG, J.; SONG, J.; ZHONG, L.; LIAO, Y.; LIU, L.; LI, X. Palmatine: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. **Biochimie**, v. 162, p. 176–184, 2019.

LONGUEFOSSE, J. L.; NOSSIN, E. Medical ethnobotany survey in Martinique. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 53, n. 3, p. 117–142, 1996.

MA, C.-Y.; LU, J.-H.; LI, X.; LIU, X.; CHEN, J.-W. Eight new cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 17, n. 4, p. 291–297, 2019.

MA, W.-K.; LI, H.; DONG, C.-L.; HE, X.; GUO, C.-R.; ZHANG, C.-F.; YU, C.-H.; WANG, C.-Z.; YUAN, C.-S. Palmatine from *Mahonia bealei* attenuates gut tumorigenesis in *ApcMin/+* mice via inhibition of inflammatory cytokines. **Molecular Medicine Reports**, v. 14, n. 1, p. 491–498, 2016.

MAAS, P.J.M.; DE KAMER, H.M.; JUNIKKA, L.; DE MELLO-SILVA, R.; RAINER, H. Annonaceae from Central-eastern Brazil. **Rodriguésia**, v. 52, p. 65–98, jun. 2001.

MCNAMARA, C.R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D.M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K.L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N.J.; CHONG, J.A.; JULIUS, D.; MORAN,

M.M.; FANGER, C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 2007.

MADHUMITHA, G.; RAJAKUMAR, G.; ROOPAN, S.M.; RAHUMAN, A.A.; PRIYA, K.M.; SARAL, A.M.; KHAN, F.R.N.; KHANNA, V.G.; VELAYUTHAM, K.; JAYASEELAN, C.; KAMARAJ, C.; ELANGO, G. Acaricidal, insecticidal, and larvicidal efficacy of fruit peel aqueous extract of *Annona squamosa* and its compounds against blood-feeding parasites. **Parasitology Research**, v. 111, n. 5, p. 2189–2199, 2012.

MAGALHÃES, K. do N.; GUARNIZ, W.A.S.; SÁ, K.M.; FREIRE, A.B.; MONTEIRO, M.P.; NOJOSA, R.T.; BIESKI, I.G.C.; CUSTÓDIO, J.B.; BALOGUN, S.O.; BANDEIRA, M.A.M. Medicinal plants of the Caatinga, northeastern Brazil: Ethnopharmacopeia (1980–1990) of the late professor Francisco José de Abreu Matos. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 237, p. 314–353, 2019.

MAINASARA, M.M.; ABU BAKAR, M.F.; MOHAMED, M.; LINATOC, A.C.; SABRAN, F. Sugar Apple—*Annona squamosa* Linn. **Exotic Fruits**. Elsevier, 2018. p. 397–402. 2018.

MARMITT, D.J.; REMPEL, C.; GOETTERT, M.I.; SILVA, A. do C.E. Plantas Mediciniais da RENISUS Com Potencial Anti-inflamatório: Revisão Sistemática Em Três Bases de Dados Científicas. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/19230>.

MATSUDA, M.; HUH, Y.; JI, R.-R. Roles of Inflammation, Neurogenic inflammation, and Neuroinflammation in Pain. **Journal of anesthesia**, v. 33, n. 1, p. 131–139, 2019.

MEDEIROS, R.; PASSOS, G.F.; VITOR, C.E.; KOEPP, J.; MAZZUCO, T.L.; PIANOWSKI, L.F.; CAMPOS, M.M.; CALIXTO, J.B. Effect of two active compounds obtained from the essential oil of *Cordia verbenacea* on the acute inflammatory responses elicited by LPS in the rat paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 151, n. 5, p. 618–627, 2007.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428–435, 2008.

MÉLIK PARSADANIANTZ, S.; RIVAT, C.; ROSTÈNE, W.; RÉAUX-LE GOAZIGO, A. Opioid and chemokine receptor crosstalk: a promising target for pain therapy? **Nature Reviews. Neuroscience**, v. 16, n. 2, p. 69–78, 2015.

MIAO, Y., XU, X.; YUAN, F.; SHI, Y.; CHEN, Y.; CHEN, J.; LI, X. Four cytotoxic annonaceous acetogenins from the seeds of *Annona squamosa*. **Natural Product Research**, v. 30, n. 11, p. 1273–1279, 2016.

MUKHERJEE, P.K.; KUMAR, V.; MAL, M.; HOUGHTON, P.J. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 14, n. 4, p. 289–300, 2007.

MULEY, M. M.; KRUSTEV, E.; MCDUGALL, J. J. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **CNS Neuroscience & Therapeutics**, v. 22, n. 2, p. 88–101, 2016.

NAGARAJA, H.; KUGAR, T.; SHIVANNA, Y.; AGRAWAL, A.; SHETTY, R. Ocular toxicity by seeds of *Annona squamosa* (custard apple). **Indian Journal of Ophthalmology**, v. 64, n. 8, p. 611–613, 2016.

NANTEL, F.; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINO, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, n. 4, p. 853–859, 1999.

NETEA, M.G.; BALKWILL, F.; CHONCHOL, M.; COMINELLI, F.; DONATH, M.Y.; GIAMARELLOS-BOURBOULIS, E.J.; GOLENBOCK, D.; GRESNIGT, M.S.; HENEKA, M.T.; HOFFMAN, H.M.; HOTCHKISS, R.; JOOSTEN, L.A.B.; KASTNER, D.L.; KORTE, M.; LATZ, E.; LIBBY, P.; MANDRUP-POULSEN, T.; MANTOVANI, A.; MILLS, K.H.G.; NOWAK, K.L.; O'NEILL, L.A.; PICKKERS, P.; VAN DER POLL, T.; RIDKER, P.M.; SCHALKWIJK, J.; SCHWARTZ, D.A.; SIEGMUND, B.; STEER, C.J.; TILG, H.; VAN DER MEER, J.W.M.; VAN DE VEERDONK, F.L.; DINARELLO, C.A. A guiding map for inflammation. **Nature Immunology**, v. 18, n. 8, p. 826–831, 2017.

NING, N.; HE, K.; WANG, Y.; ZOU, Z.; WU, H.; LI, X.; YE, X. Hypolipidemic Effect and Mechanism of Palmatine from *Coptis chinensis* in Hamsters Fed High-Fat diet. **Phytotherapy research: PTR**, v. 29, n. 5, p. 668–673, 2015.

OAKLEY, R. H.; CIDLOWSKI, J. A. The Biology of the Glucocorticoid Receptor: New Signaling Mechanisms in Health and Disease. **The Journal of allergy and clinical immunology**, v. 132, n. 5, p. 1033–1044, 2013.

OKECHUKWU, P.N.; EKEUKU, S.O.; CHAN, H.K.; ELURI, K.; FROEMMING, G.R.A. Palmatine Inhibits Up-Regulation of GRP78 and CALR Protein in an STZ-Induced Diabetic Rat Model. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 22, n. 2, p. 288–298, 2021.

ONG, H. G.; KIM, Y.-D. Quantitative ethnobotanical study of the medicinal plants used by the Ati Negrito indigenous group in Guimaras island, Philippines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 228–242, 2014.

PANDA, S.; KAR, A. Antidiabetic and antioxidative effects of *Annona squamosa* leaves are possibly mediated through quercetin-3-O-glucoside. **BioFactors (Oxford, England)**, v. 31, n. 3–4, p. 201–210, 2007.

PATIL, K.R.; MAHAJAN, U.B.; UNGER, B.S.; GOYAL, S.N.; BELEMKAR, S.; SURANA, S.J.; OJHA, S.; PATIL, C.R. Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 18, 5 2019.

PAULA-FREIRE, L.I.G.; ANDERSEN, M.L.; GAMA, V.S.; MOLSKA, G.R.; CARLINI, E.L.A. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine: International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology**, v. 21, n. 3, p. 356–362, 2014.

PERRETTI, M.; COOPER, D.; DALLI, J.; NORLING, L.V. Immune resolution mechanisms in inflammatory arthritis. **Nature Reviews. Rheumatology**, v. 13, n. 2, p. 87–99, 2017.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1–5, 2012.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron-Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PINTO, N.C.C.; SILVA, J.B.; MENEGATI, L.M.; GUEDES, M.C.M.R.; MARQUES, L.B.; SILVA, T.P.D.; MELO, R.C.N.D.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.D.; SALVADOR, M.J.; SCIO, E.; FABRI, R.L. Cytotoxicity and bacterial membrane destabilization induced by *Annona squamosa* L. extracts. **Anais Da Academia Brasileira De Ciencias**, v. 89, n. 3 Suppl, p. 2053–2073, 2017.

PIOMELLI, D.; SASSO, O. Peripheral gating of pain signals by endogenous analgesic lipids. **Nature neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 164–174, 2014.

PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S.; YABESH, J.E.M.; RAVICHANDRAN, K.; SAKTHIVEL, B. Documentation and quantitative analysis of the local knowledge on medicinal plants in Kalrayan hills of Villupuram district, Tamil Nadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 7–20, 2014.

QUATRINI, L.; UGOLINI, S. New insights into the cell- and tissue-specificity of glucocorticoid actions. **Cellular and Molecular Immunology**, p. 1–10, 2020.

QUÍLEZ, A.M.; FERNÁNDEZ-ARCHE, M.A.; GARCÍA-GIMÉNEZ, M.D.; DE LA PUERTA, R. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 225, p. 244–270, 2018.

RIBEIRO, R.V.; BIESKI, I.G.C.; BALOGUN, S.O.; MARTINS, D.T. DE O. Ethnobotanical study of medicinal plants used by Ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 205, p. 69–102, 2017.

RONCHETTI, S.; MIGLIORATI, G.; DELFINO, D. V. Association of inflammatory mediators with pain perception. **Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie**, v. 96, p. 1445–1452, 2017.

ROTH, G. A. *et al.* Global, regional, and national age-sex-specific mortality for 282 causes of death in 195 countries and territories, 1980–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. **The Lancet**, v. 392, n. 10159, p. 1736–1788, 2018.

RUAN, Y.; GU, L.; YAN, J.; GUO, J.; GENG, X.; SHI, H.; YU, G.; ZHU, C.; YANG, Y.; ZHOU, Y.; WANG, C.; TANG, Z. An effective and concise device for detecting cold allodynia in mice. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 14002, 2018.

SALA, A.; PROSCHAK, E.; STEINHILBER, D.; ROVATI, G.E. Two-pronged approach to anti-inflammatory therapy through the modulation of the arachidonic acid cascade. **Biochemical Pharmacology**, v. 158, p. 161–173, 2018.

ŠANTIĆ, Ž.; PRAVDIĆ, N.; BEVANDA, M.; GALIĆ, K. The historical use of medicinal plants in traditional and scientific medicine. **Psychiatria Danubina**, v. 29, n. Suppl 4, p. 787–792, 2017.

SANTOS, C.C. DE M.P.; SALVADORI, M.S.; MOTA, V.G.; COSTA, L.M.; DE ALMEIDA, A.A.C.; DE OLIVEIRA, G.A.L.; COSTA, J.P.; DE SOUSA, D.P.; DE FREITAS, R.M.; DE ALMEIDA, R.N. Antinociceptive and Antioxidant Activities of Phytol In Vivo and In Vitro Models. **Neuroscience Journal**, v. 2013, 2013.

SANTOS, W.N.L.D.; SAUTHIER, M.C.S.; CAVALCANTE, D.D.; BENEVIDES, C.M.J.; DIAS, F.S.; SANTOS, D.C.M.B. Mineral composition, nutritional properties, total phenolics and flavonoids compounds of the atemoya fruit (*Annona squamosa* L. x *Annona cherimola* Mill.) and evaluation using multivariate analysis techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 88, p. 1243–1252, 2016.

SARAIVA, S.R.G.L.; SARAIVA, H.C.C.; OLIVEIRA-JÚNIOR, R.G.; DE, SILVA, J.C.; DAMASCENO, C.M.D.; ALMEIDA, J.R.G. DA S.; AMORIM, E.L.C. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, 2015.

SCHMIDT, M.; LAMBERTS, M.; OLSEN, A.-M.S.; FOSBØLL, E.; NIESSNER, A.; TAMARGO, J.; ROSANO, G.; AGEWALL, S.; KASKI, J.C.; KJELDSSEN, K.; LEWIS, B.S.; TORP-PEDERSEN, C. Cardiovascular safety of non-aspirin non-steroidal anti-inflammatory drugs: review and position paper by the working group for Cardiovascular Pharmacotherapy of the European Society of Cardiology. **European Heart Journal**, v. 37, n. 13, p. 1015–1023, 2016.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, n. 7503, p. 92–101, 2014.

SHANKER, K.S.; KANJILAL, S.; RAO, B.V.S.K.; KISHORE, K.H.; MISRA, S.; PRASAD, R.B.N. Isolation and antimicrobial evaluation of isomeric hydroxy ketones in leaf cuticular waxes of *Annona squamosa*. **Phytochemical analysis: PCA**, v. 18, n. 1, p. 7–12, 2007.

SHEHATA, M.G.; ABU-SERIE, M.M.; ABD EL-AZIZ, N.M.; EL-SOHAIMY, S.A. Nutritional, phytochemical, and in vitro anticancer potential of sugar apple (*Annona squamosa*) fruits. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 6224, 2021.

SHEN, Y.; GUAN, S.; GE, H.; XIONG, W.; HE, L.; LIU, L.; YIN, C.; LIU, H.; LI, G.; XU, C.; XU, H.; LIU, S.; LI, G.; LIANG, S.; GAO, Y. Effects of palmatine on rats with comorbidity of diabetic neuropathic pain and depression. **Brain Research Bulletin**, v. 139, p. 56–66, 2018.

SILAMBARASAN, R.; SURESHKUMAR, J.; KRUPA, J.; AMALRAJ, S.; AYYANAR, M. Traditional herbal medicines practiced by the ethnic people in Sathyamangalam forests of Western Ghats, India. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 16, p. 61–72, 2017.

SILVA, R.O.; SOUSA, F.B.M.; DAMASCENO, S.R.B.; CARVALHO, N.S.; SILVA, V.G.; OLIVEIRA, F.R.M.A.; SOUSA, D.P.; ARAGÃO, K.S.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, R.M.; MEDEIROS, J.V.R. Phytol, a diterpene alcohol, inhibits the inflammatory response by reducing cytokine production and oxidative stress. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 28, n. 4, p. 455–464, 2014.

SINGH, D.; MISHRA, B.; MISHRA, R. Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activity of *Annona squamosa* L. Leaf Extract in Mice and Rats. **Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, 2012.

SIVASANKARI, B.; ANANDHARAJ, M.; GUNASEKARAN, P. An ethnobotanical study of indigenous knowledge on medicinal plants used by the village peoples of Thoppampatti, Dindigul district, Tamilnadu, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 153, n. 2, p. 408–423, 2014.

SONI, V.K.; YADAV, D.K.; BANO, N.; DIXIT, P.; PATHAK, M.; MAURYA, R.; SAHAI, M.; JAIN, S.K.; MISRA-BHATTACHARYA, S.N-Methyl-6, 7-dimethoxyisoquinolone in *Annona squamosa* twigs is the major immune modifier to elicit polarized Th1 immune response in BALB/c mice. **Fitoterapia**, v. 83, n. 1, p. 110–116, 2012.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiosperma da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005.

STEIN, C. Opioid Receptors. **Annual Review of Medicine**, v. 67, p. 433–451, 2016.

SURESH, K.; MANOHARN, S.; BLESSY, D. Protective role of *Annona squamosa* linn bark extracts in DMBA induced genotoxicity. **Kathmandu University medical journal (KUMJ)**, v. 6, n. 23, p. 364–369, 2008.

SUWARDI, A.B., NAVIA, Z.I., HARMAWAN, T., SYAMSUARDI, MUKHTAR, E., Ethnobotany and conservation of indigenous edible fruit plants in South Aceh, Indonesia. **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 21, n. 5, 2020.

TANG, C.; HONG, J.; HU, C.; HUANG, C.; GAO, J.; HUANG, J.; WANG, D.; GENG, Q.; DONG, Y. Palmatine Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of the AMPK/Nrf2 Pathway. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2021, 2021.

TARABASZ, D.; KUKULA-KOCH, W. Palmatine: A review of pharmacological properties and pharmacokinetics. **Phytotherapy Research**, v. 34, n. 1, p. 33–50, 2020.

THAKUR, P.; CHAWLA, R.; GOEL, R.; NARULA, A.; ARORA, R.; SHARMA, R.K. Augmenting the potency of third-line antibiotics with *Berberis aristata*: In vitro synergistic activity against carbapenem-resistant *Escherichia coli*. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 6, p. 10–16, 2016.

TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. A General Introduction to Glucocorticoid Biology. **Frontiers in Immunology**, v. 10, p. 1545, 2019.

UMAMAHESHWARI, A.; ARUNKUMAR, A.; VEDHAHARI, B.N.; SURYAPRABHA, D.; PUNITHA, S. Phytochemical Evaluation and Antinflammatory Activity of Seed Extract of *Annona Squamosa*. **International Journal of Chemical Sciences**, v. 6, n. 3, p. 1594–1599, 2008.

VIJAYAKUMAR, S.; MORVIN YABESH, J.E.; PRABHU, S.; MANIKANDAN, R.; MURALIDHARAN, B. Quantitative ethnomedicinal study of plants used in the

Nelliyampathy hills of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 238–254, 2015.

WANG, B.; WU, L.; CHEN, J.; DONG, L.; CHEN, C.; WEN, Z.; HU, J.; FLEMING, I.; WANG, D.W. Metabolism pathways of arachidonic acids: mechanisms and potential therapeutic targets. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 94, 26 fev. 2021.

WANG, J.; JIANG, Y.; WANG, B.; ZHANG, N. A review on analytical methods for natural berberine alkaloids. **Journal of Separation Science**, v. 42, n. 9, p. 1794–1815, 2019.

WANG, L.; WANG, X.; ZHANG, S.-L.; ZHU, X.-M.; LIU, Y.-Q.; SONG, Z.-J.; DU, W.-J.; JI, J.; CUI, C.-L.; HE, X.; ZHANG, C.-F.; GUO, C.-R.; WANG, C.-Z.; YUAN, C.-S. Gastroprotective effect of palmatine against acetic acid-induced gastric ulcers in rats. **Journal of Natural Medicines**, v. 71, n. 1, p. 257–264, 2017.

WILLIAMS, D. M. Clinical Pharmacology of Corticosteroids. **Respiratory Care**, v. 63, n. 6, p. 655–670, 2018.

WU, P.; WU, M.; XU, L.; XIE, H.; WEI, X. Anti-inflammatory cyclopeptides from exocarps of sugar-apples. **Food Chemistry**, v. 152, p. 23–28, 2014.

XIAO, C.-W.; JI, Q.-A.; WEI, Q.; LIU, Y.; BAO, G.-L. Antifungal activity of berberine hydrochloride and palmatine hydrochloride against *Microsporum canis* -induced dermatitis in rabbits and underlying mechanism. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, p. 177, 2015.

YABESH, J. E. M.; PRABHU, S.; VIJAYAKUMAR, S. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, n. 3, p. 774–789, 2014.

YADAV, D.K.; SINGH, N.; DEV, K.; SHARMA, R.; SAHAI, M.; PALIT, G.; MAURYA, R. Anti-ulcer constituents of *Annona squamosa* twigs. **Fitoterapia**, v. 82, n. 4, p. 666–675, 2011.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. **Anesthesia and Analgesia**, v. 94, n. 4, p. 962–967, 2002.

YAN, B.; WANG, D.; DONG, S.; CHENG, Z.; NA, L.; SANG, M.; YANG, H.; YANG, Z.; ZHANG, S.; YAN, Z. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- κ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells. **International Immunopharmacology**, v. 45, p. 194–200, 2017.

YANG, Y.-L.; HUA, K.-F.; CHUANG, P.-H.; WU, S.-H.; WU, K.-Y.; CHANG, F.-R.; WU, Y.-C. New cyclic peptides from the seeds of *Annona squamosa* L. and their anti-inflammatory activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 56, n. 2, p. 386–392, 2008.

YIN, Z.-Y.; LI, L.; CHU, S.-S.; SUN, Q.; MA, Z.-L.; GU, X.-P. Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. **Scientific Reports**, v. 6, n. 1, p. 27129, 2016

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, p. 147–152, 2001.

ZARRIN, A.A.; BAO, K.; LUPARDUS, P.; VUCIC, D. Kinase inhibition in autoimmunity and inflammation. **Nature Reviews. Drug Discovery**, v. 20, n. 1, p. 39–63, 2021.

ZHANG, L.; LI, J.; MA, F.; YAO, S.; LI, N.; WANG, J.; WANG, Y.; WANG, X.; YAO, Q. Synthesis and Cytotoxicity Evaluation of 13-n-Alkyl Berberine and Palmatine Analogues as Anticancer Agents. **Molecules**, v. 17, n. 10, p. 11294–11302, 2012.

ZHANG, X.-Y.; DOU, Y.-N.; YUAN, L.; LI, Q.; ZHU, Y.-J.; WANG, M.; SUN, Y.-G. Different neuronal populations mediate inflammatory pain analgesia by exogenous and endogenous opioids. **eLife**, v. 9, p. e55289, 2020.

ZHOU, X.; LI, H.; SHI, Z.; GAO, S.; WEI, S.; LI, K.; WANG, J.; LI, J.; WANG, R.; GONG, M.; ZHAO, Y.; XIAO, X. Chondroprotective effects of palmatine on osteoarthritis in vivo and in vitro: A possible mechanism of inhibiting the Wnt/ β -catenin and Hedgehog signaling pathways. **International Immunopharmacology**, v. 34, p. 129–138, 2016.

ZHOU, X.; LIN, X.; XIONG, Y.; JIANG, L.; LI, W.; LI, J.; WU, L. Inhibition activity of a traditional Chinese herbal formula Huang-Lian-Jie-Du-Tang and its major components found in its plasma profile on neuraminidase-1. **Scientific Reports**, v. 7, 2017.

5 APÊNDICES

5.1 Artigo 1: Analgesic and anti-arthritic properties of methanolic extract and palmatine obtained from *Annona squamosa* - submetido a revista **Journal of Ethnopharmacology** (Qualis A2; FI: 4.360)

Link (normas da revista):

https://www.elsevier.com/wps/find/journaldescription.cws_home/506035?generatepdf=true

ARTIGO EM ANEXO (SUBMETIDO)

Journal of Ethnopharmacology
Analgesic and anti-arthritic properties of methanolic extract and
palmitine obtained from *Annona squamosa*
 --Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Research Paper
Keywords:	<i>Annona squamosa</i> ; Palmitine; Antihyperalgesic; Inflammation; Arthritis, Mice
Corresponding Author:	Candida Kassuya Federal University of Grande Dourados Dourados, Mato Grosso do Sul BRAZIL
First Author:	Candida Kassuya
Order of Authors:	Candida Kassuya Caren Naomi Aguero Ito Elisangela dos Santos Saulo Euclides Silva-Filho Taise Fonseca Pedroso Caroline Caramano de Lourenço Arielle Cristina Arena Marcos José Salvador
Abstract:	<p>Ethnopharmacological relevance</p> <p><i>Annona squamosa</i> (leaves, or all parts of the plant) is used in folk medicine to treat pain in the body and against arthritis. Furthermore, palmitine, an alkaloid isolated from the <i>A. squamosa</i> leaves, has a broad spectrum of pharmacological effects already described in the literature. However, the analgesic and or anti-arthritic potential (anti-nociceptive and antihyperalgesic) of this compound have not been fully elucidated.</p> <p>Study objective</p> <p>Since palmitine is present in the methanolic extract of <i>A. squamosa</i> leaves (EMAS), the aim of the present study was to investigate the analgesic (anti-nociceptive and antihyperalgesic), anti-arthritic potential and anti-inflammatory effects of EMAS and palmitine in inflammation-related models of mechanical nociception and hyperalgesia in mice.</p> <p>Material and methods</p> <p>The chemical profile and the analysis of the presence of alkaloids in the EMAS extract was performed by ultra-high efficiency liquid chromatography with electrospray ionization coupled to sequential mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS). EMAS (30, 100 and 300 mg/kg) and palmitine (0.3, 1 and 3 mg/kg) were tested, orally (p.o.), in carrageenan-induced pleurisy test (leukocyte migration, protein extravazation and nitric oxide (NO) levels were analyzed). EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmitine (1 mg/kg, p.o.) were tested in zymosan-induced joint inflammation and in formalin models. The animals were treated with 3 and 30 µg/paw of palmitine to evaluate the possible mechanism of action and mechanical hyperalgesia was measured 3 and 4 hours after TNF (paw application). An in vitro study of EMAS and palmitine on leukocyte viability was performed in methylthiazolidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test.</p> <p>Results</p> <p>The analysis of the chemical profile showed the presence of alkaloids palmitine, liriodenine and anonaine. Oral treatment of EMAS (100 and 300 mg/kg) and palmitine</p>

	<p>(1 and 3 mg/kg) significantly inhibited leukocyte migration and NO production in the carrageenan-induced pleurisy model. EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmatine (1 mg/kg, p.o.) inhibited parameters (mechanical hyperalgesia, leukocyte migration, oedema and nitric oxide) in the joint inflammation induced by zymosan. In the formalin test, both EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmatine (1 mg/kg, p.o.) were effective against mechanical and cold hyperalgesia. In addition, palmatine reduced the second phase of the formalin test (inflammatory phase). In the mechanism of action analysis, intraplantar treatment of palmatine (3 and 30 µg/paw) prevented mechanical hyperalgesia, 3 and 4 hours after TNF. Furthermore, EMAS and palmatine showed no cytotoxicity in vitro.</p> <p>Conclusions</p> <p>This study confirms the analgesic, anti-arthritic and anti-inflammatory activity of EMAS and palmatine, which may explain, in part, the popular use of this plant as a natural analgesic and/or anti-arthritic agent. Furthermore, palmatine could be one of the compounds responsible for the anti-hyperalgesic and/or anti-arthritic properties of this medicinal plant</p>
Suggested Reviewers:	<p>Sara Santos Bernardes, PhD Professor, Federal University of Minas Gerais Triangulo School of Medicine: Universidade Federal do Triangulo Mineiro Faculdade de Medicina sara.sbernardes@gmail.com She works with natural products and with models of experimental inflammation and pain.</p> <p>Aline Inada, PhD Professor, Federal University of Mato Grosso: Universidade Federal de Mato Grosso inadaaline@gmail.com She works with natural products and with models of experimental inflammation and pain.</p>

Declaration of interests

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

The authors declare the following financial interests/personal relationships which may be considered as potential competing interests:

The authors declare that they have no conflicts of interest in this work.

Dourados, November 26th, 2021

Editor-in-Chief

Journal of Ethnopharmacology

We would like to submit the manuscript, "*Analgesic and anti-arthritic properties of methanolic extract and palmatine obtained from Annona squamosa*" for consideration and publication in the Journal of Ethnopharmacology.

The leaves of *Annona squamosa* (Annonaceae), known as "fruta-do-conde" are used in folk medicine as an analgesic agent (to treat pain in the body) and against arthritis (Quílez et al., 2018). Furthermore, palmatine, an alkaloid isolated from the *A. squamosa* leaves, has a broad spectrum of pharmacological effects already described in the literature. However, the analgesic or anti-arthritic potential activities (anti-nociceptive and antihyperalgesic) of this substance and the methanolic extract from *A. squamosa* (EMAS) have not been fully elucidated.

The extract was chemically analyzed and revealed the presence of palmatine, lirioidenine and anonaine. The dose-dependent effects of pure palmatine and EMAS have been tested in pleurisy model and the analysis demonstrated that EMAS (100 and 300 mg/kg), and palmatine (1 and 3 mg/kg) acted in a dose-dependent manner in the inhibition of leukocyte migration.

The dose of 100 mg/kg of EMAS and the dose of 1 mg/kg of palmatine were effective to inhibit mechanical hyperalgesia, leukocyte migration and oedema in zymosan articular inflammation model. EMAS and palmatine also inhibited the mechanical hyperalgesia and cold sensitivity in formalin induced nociception. In addition, palmatine reduced the second phase of the formalin test (inflammatory phase). These results show that EMAS and

palmatine had antiarthritic and analgesic potential which can explain, at least in part, the anti-arthritic/analgesic potential of *A. squamosa* in popular medicine.

Palmatine showed efficacy on the TNF model, however the result of this test did not discard that palmatine antagonizes other inflammatory/nociceptive pathways. This study confirms the anti-arthritic/analgesic properties of EMAS and shows that palmatine could be responsible for the EMAS anti-arthritic/analgesic effects.

We thank you for considering this manuscript for publication in Journal of Ethnopharmacology and hope that the manuscript is in accordance with necessary requirements.

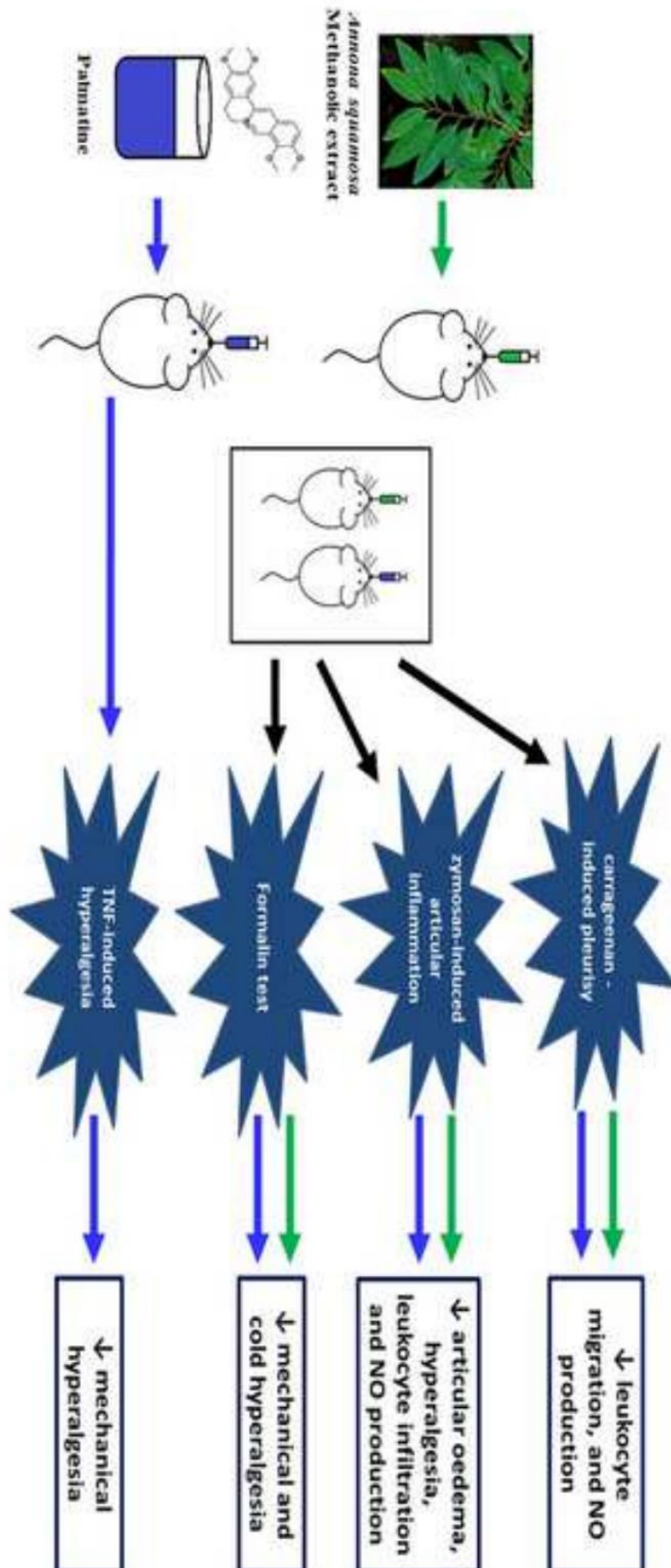
Sincerely,

Prof. Candida Aparecida Leite Kassuya

Professor of Clinical Pharmacology and Toxicology

Universidade da Grande Dourados

Dourados, MS, Brazil



Analgesic and anti-arthritic properties of methanolic extract and palmatine obtained from Annona squamosa

Caren Naomi Aguero Ito^a,
 Elisangela dos Santos^a,
 Saulo Euclides Silva-Filho^c, Taíse Fonseca
 Pedroso^b, Caroline
 Caramano de Lourenço^b,
 Arielle Cristina Arena^d,
 Marcos José Salvador^b,
 Candida Aparecida Leite
 Kassuya^a.

^a College of Health
 Science, Federal
 University of Grande
 Dourados, Dourados, MS,
 Brazil

^b Institute of Biology, Department of Plant Biology, PPG BCE, University of Campinas (UNICAMP), 13083-970 Campinas, São Paulo, Brazil

^cPharmaceutical Sciences, Food and Nutrition College, Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, Mato Grosso do Sul State, Brazil.

^dDepartment of Structural and Functional Biology, Institute of Biosciences of Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Botucatu, São Paulo State, Brazil.

Email addresses:

CNAI: itonaomi@live.com

ES: elisangelaprocopiosan@gmail.com

SES-F: saulo.e@ufms.br

TFP: taisefpedroso@gmail.com

CCL: ca_jau@hotmail.com

ACA: arielle.arena@unesp.br

MJS: marcosjs@unicamp.br

CALK: candida2005@gmail.com

* Author for correspondence: Candida Aparecida Leite Kassuya (candida2005@gmail.com) -

Address: School of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados - Dourados,

Mato Grosso do Sul State, Brazil. Rodovia Dourados-Itahum, km 12, 79825-070, MS, Brazil,

Phone: +55 67 3410-2326 Fax: +55 67 3410-2326.

Abstract

Ethnopharmacological relevance: *Annona squamosa* (leaves, or all parts of the plant) is used in folk medicine to treat pain in the body and against arthritis. Furthermore, palmatine, an alkaloid isolated from the *A. squamosa* leaves, has a broad spectrum of pharmacological effects already described in the literature. However, the analgesic and or anti-arthritic potential (anti-nociceptive and antihyperalgesic) of this compound have not been fully elucidated.

Study objective: Since palmatine is present in the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS), the aim of the present study was to investigate the analgesic (anti-nociceptive and antihyperalgesic), anti-arthritic potential and anti-inflammatory effects of EMAS and palmatine in inflammation-related models of mechanical nociception and hyperalgesia in mice.

Material and methods: The chemical profile and the analysis of the presence of alkaloids in the EMAS extract was performed by ultra-high efficiency liquid chromatography with electrospray ionization coupled to sequential mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS/MS). EMAS (30, 100 and 300 mg/kg) and palmatine (0.3, 1 and 3 mg/kg) were tested, orally (p.o.), in carrageenan-induced pleurisy test (leukocyte migration, protein extravazation and nitric oxide (NO) levels were analyzed). EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmatine (1 mg/kg, p.o.) were tested in zymosan-induced joint inflammation and in formalin models. The animals were treated with 3 and 30 pg/paw of palmatine to evaluate the possible mechanism of action and mechanical hyperalgesia was measured 3 and 4 hours after TNF (paw application). An *in vitro* study of EMAS and palmatine on leukocyte viability was performed in methylthiazolidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test.

Results: The analysis of the chemical profile showed the presence of alkaloids palmatine, liriodenine and anonaine. Oral treatment of EMAS (100 and 300 mg/kg) and palmatine (1 and 3 mg/kg) significantly inhibited leukocyte migration and NO production in the carrageenan-induced pleurisy model. EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmatine (1 mg/kg, p.o.) inhibited parameters (mechanical hyperalgesia, leukocyte migration and oedema) in the joint inflammation induced by zymosan. In the formalin test, both EMAS (100 mg/kg, p.o.) and palmatine (1 mg/kg, p.o.) were effective against mechanical and cold hyperalgesia. In addition, palmatine reduced the second phase of the formalin test (inflammatory phase). In the mechanism of action analysis, intraplantar treatment of palmatine (3 and 30 pg/paw) prevented mechanical hyperalgesia, 3 and 4 hours after TNF. Furthermore, EMAS and palmatine showed no cytotoxicity *in vitro*.

Conclusions: This study confirms the analgesic, anti-arthritic and anti-inflammatory activity of EMAS and palmatine, which may explain, in part, the popular use of this plant as a natural analgesic and/or anti-arthritic agent. Furthermore, palmatine could be one of the

compounds responsible for the anti-hyperalgesic and/or anti-arthritic properties of this medicinal plant.

Key words: *Annona squamosa*; Palmatine; Antihyperalgesic; Inflammation; Arthritis, Mice.

Abbreviations: Bovine serum albumin (BSA); Calcitonin gene-related peptide (CGRP); Cyclooxygenase-2 (COX-2); Dimethylsulfoxide (DMSO); Electrospray mass spectrometry (ESI-MS); Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA); Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA); Extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2); Federal University of Grande Dourados (UFGD); High performance liquid chromatography (HPLC); Infrared (IR); Interleukin-1 β (IL-1 β); Interleukin-6 (IL-6); Interleukin-10 (IL-10); Intra-articular (i.a.); Lipopolysaccharide (LPS); Mean Standard Error (SEM); Methanolic extract of *Annona squamosa* leaves (EMAS); Methylthiazolidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT); Nitric Oxide (NO); Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDS); Nuclear magnetic resonance (NMR); Phosphate Buffered Saline (PBS); Phosphate Buffered Saline/Ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA); Palmatine (PALM); Prednisolone (PRED); Ultra-high efficiency liquid chromatography–electrospray ionization mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS); Selective cyclooxygenase-2 inhibitors (COXIBs); Tumor necrose factor (TNF); ultra high performance liquid chromatography (UHPLC-MS); White blood cell (WBC).

1. Introduction

Inflammation is a complex process involving multiple signaling pathways (Furman *et al.*, 2019) and if unsolved this process can lead to chronic inflammation (Furman *et al.*, 2019). In chronic inflammation, pain, oedema, and function loss are three of the five cardinal signs that (Ronchetti *et al.*, 2017) may be present (Baral *et al.*, 2019).

The main pharmacological treatment of pain involves opioid analgesics and nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and their long-term use can cause various side effects such as opioid-induced dependence while NSAIDs can lead to ulcer development (non-selective NSAIDs) or cardiovascular thrombotic events (selective (cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors (COXIBs) (Arthur and Bruera, 2019; Bertin *et al.*, 2021). Regarding treatment of inflammation, the main drugs used are NSAIDs and glucocorticoids. The chronic treatment with the latter can lead to adrenal insufficiency, insulin resistance and other health problems (Barnes and Adcock, 2009; Quatrini and Ugolini, 2020). Taking into account the need for new anti-inflammatory and analgesic drugs, the analysis of the biological activities of medicinal plants and their isolated substances is important for the development and discovery of new drugs.

Annona squamosa L. (Annonaceae) is an exotic tree, known as fruta-do-conde (Brazil) or Seetha pazham (Chinnasamy *et al.*, 2019) popularly used, by oral route, for several medicinal purposes such as difficulty in urinating (Philippines – Ong and Kim, 2014), hair growth (India – Yabesh *et al.*, 2014) inflammation, cancer among others (Chinnasamy *et al.*, 2019; Li and Xing, 2016; Longuefosse and Nossin, 1996). In the Philippines it is popularly used topically for headache and mumps, cuts and wounds (Abe and Ohtani, 2013; Ong and Kim, 2014). The juice of the whole plant or the powder of the leaves, for instance, are used by the population to treat body pain (Vijayakumar *et al.*, 2015; Yabesh *et al.*, 2014) and against arthritis (Quílez *et al.*, 2018).

In scientific studies, the ethanolic extract of the leaves of *A. squamosa* from this plant, for example, showed efficacy in the nociception model induced by acetic acid (peripheral action) and in hot plate test (central action) (Singh *et al.*, 2012). In addition, ethanolic extract of the leaves and seeds obtained from *A. squamosa* reduced carrageenan-induced paw oedema (Singh *et al.*, 2012; Umamaheshwari *et al.*, 2008). Among the substances isolated from this

plant that may be related to this action are caryophyllene oxide (which was isolated from petroleum ether extract from the bark) and palmatine (Chavan *et al.*, 2010).

Palmatine has several pharmacological properties such as hypolipidemic action (Ning *et al.*, 2015), antiproliferative (Hambright *et al.*, 2015), gastroprotective (Wang *et al.*, 2017), neuroprotective (Haj *et al.*, 2018), antidepressant (Shen *et al.*, 2018), chondroprotective (Zhou *et al.*, 2016) and anti-inflammatory (Yan *et al.*, 2017). In addition, palmatine showed anti-hyperalgesic effects against diabetic neuropathy (mechanical and thermal hyperalgesia) (Shen *et al.*, 2018) and trigeminal neuralgia models (mechanical hyperalgesia) in rats (He *et al.*, 2020). No studies showed the anti-nociceptive of palmatine.

Considering this, this research aims to analyze the chemical profile and the presence of alkaloids in the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS); the anti-inflammatory, antinociceptive and anti-hyperalgesic action of EMAS and its isolated compound (palmatine) mediated by different inducers of inflammation (zymosan, carrageenan) and pain (formalin). The mechanisms of action of palmatine was also investigated in relation to Tumor necrose factor (TNF) pathway as well as the cytotoxic effects of EMAS and palmatine *in vitro* (methylthiazolidiphenyl-tetrazolium bromide (MTT) test).

2. Material and Methods

2.1 Botanical material, EMAS acquisition and isolation of palmatine

The *A. squamosa* leaves were collected from a specimen grown at the Biology Institute of Unicamp (22°49'10.1 "S 47°04'16.3 "W) and registered at National System for the Management of Genetic Heritage and Associated Traditional Knowledge (Access Register No. A709776). The collected raw plant material was stabilized and dried in a circulating air oven at 40 °C (up to seven days) and then pulverized in a knife mill. The obtained powder (1000 g) was submitted to a maceration process with organic solvents hexane (low polarity) and

methanol (high polarity), in the proportion 1:20 (powder/extracting liquid, v/v). After evaporation of the extracted liquid in an evaporator under reduced pressure, the crude hexane (121.5 g) and methanol (EMAS, 72.3g) extracts were obtained. The composition of EMAS analyzed by rapid ultrahigh performance liquid chromatography–electrospray ionization tandem mass spectrometry (UHPLC-ESI-MS) showed the presence of alkaloids. EMAS (2.0 g) was then subjected to acid-base extraction according to COSTA *et al.*, (2010) for alkaloids constituent's isolation. After solvent elimination (using evaporator) under reduced pressure, the alkaloid chloroform fraction and the basic aqueous fraction were obtained. The alkaloidic chloroform fraction was submitted to conventional chromatographic procedures such as classical column chromatography, preparative thin layer chromatography and HPLC. The protoberberine alkaloid palmatine (20 mg) was isolated and identified using spectroscopic (UV, IR, 1D and 2D NMR) and mass spectrometric (ESI-MS) methods. The yield of the palmatine alkaloid was 1% in the EMAS extract.

2.2 Reagents

All reagents used for this work have a high analytical grade.

2.3 Animals, dissolution of EMAS and palmatine and description of the doses used in the *in vivo* and *in vitro* models

Female and male *Swiss* mice (28 - 32 g) were provided by the central vivarium at UFGD. The animals were kept in polypropylene boxes in a sector animal house at the Faculdade de Ciências da Saúde, UFGD, with the following conditions: 22°C, in the presence of a 12-hour light/dark cycle, with food and water *ad libitum*. The experiments were

performed at UFGD. The experiments were performed after approval by the UFGD Animal Use Ethics Committee (13.2020).

EMAS was dissolved in saline solution (0.9%) which was used to treat the animals and the dose was calculated according to the weight of the mice. The vehicle to treat the animals was saline solution (0.9%).

The inhibitory oral action of EMAS (30, 100 and 300 mg/kg) and palmatine (0.3, 1, or, 3 mg/kg) was investigated in order to evaluate the dose-response aspects in the carrageenan-induced pleurisy model. The effective dose of EMAS was 100 mg/kg and the dose of 1 mg/kg of palmatine was selected to test, in zymosan and formalin models, since the palmatine comprises about 1 % of EMAS. In addition, prednisolone (3 mg/kg, orally) was used as a positive control drug in inflammatory models.

2.4 EMAS and palmatine test in carrageenan-induced pleurisy

Female *Swiss* mice were divided in groups (n=5) and treated orally with vehicle (naïve and control groups), EMAS (30, 100 or 300 mg/kg), palmatine (0.3, 1, or, 3 mg/kg) and prednisolone (3 mg/kg). One hour after the treatment, pleurisy was induced by injecting 100 µL of carrageenan solution (1 % diluted in sterile saline) into the intrapleural cavity (Vinegar *et al.*, 1973). The animals in the naïve group received similar injections of 0.9% saline solution. Four hours after the induction of pleurisy, the animals were euthanized. The chest cavity was opened, and the exudate was collected by washing the cavity in 1000 µL of Phosphate Buffered Saline/Ethylenediaminetetraacetic acid (PBS/EDTA) solution. Part of the obtained sample was diluted in Turk's fluid for leukocytes count using Neubauer chamber while another part was used for protein dosage by Bradford method, nitric oxide dosage by Griess method.

2.5 EMAS and palmatine test on zymosan-induced joint inflammation

Female Swiss mice were divided into four groups and treated with vehicle (control), palmatine (1 mg/kg) and EMAS (100 mg/kg), and prednisolone (3 mg/kg - positive control drug). One hour later, inflammation was induced by intra-articular (i.a.) injection of zymosan (200 µg/cavity in 10 µL sterile saline solution) in the left knee junction through the suprapatellar ligament (Penido *et al.*, 2006). Oedema (digital micrometer) and mechanical hyperalgesia (electronic Von frey) were measured 4 and 6 hours after zymosan injection. Six hours after the induction of inflammation, the animals were euthanized (with dose of 300 mg/kg of ketamine and 30 mg/kg of xylazine, by intraperitoneal route (i.p.). The inflamed joint was surgically exposed and washed with 10 µL of PBS containing EDTA (10 mM). Subsequently, 40 µL of this solution of PBS/EDTA was added to the collected exudate. Part of the sample was diluted in Turk's solution for leukocyte count in Neubauer's chamber.

2.6 EMAS and palmatine test on formalin-induced nociception

Male Swiss mice were distributed into 3 groups (n=5) and treated orally with vehicle (control), palmatine (1 mg/kg) and EMAS (100 mg/kg). One hour after the treatment, 1% formalin (30 µL/animal) was injected into the right hind paw of the animals (intraplantar route).

The mice were placed individually in glass funnels and observed for nociceptive behavior (licking and biting) during two phases (0–5 min initially and a second phase at 15–30 min) (Hunskar and Hole, 1987; Leitão *et al.*, 2020).

Subsequently, 30 μ L of acetone was applied to the surface of the injected paw, and the times the animal raised their paw in the first 20 seconds were counted. In addition, mechanical hyperalgesia was analyzed using the electronic Von Frey and the oedema volume was measured using a digital plethysmometer.

2.8. Palmatine test on TNF-induced hyperalgesia

The TNF-induced hyperalgesia test was performed according to Aquino *et al.*, (2015) to verify whether palmatine has a direct effect on mechanical hyperalgesia. Before intraplantar administration of palmatine, the mechanical baseline value of the right hind paw of all animals was determined using a digital Von Frey analgesimeter.

Subsequently, the animals were distributed in 3 groups (n=5) and received 30 μ L of the following solutions intraplantarly (right hind paw): vehicle (control) and palmatine solution (3 and 30 μ g/paw). After 30 minutes, an intraplantar injection of 20 μ L of TNF (100 pg) was made into the same paw treated previously. Three and four hours after the induction of inflammation by TNF, the mechanical hyperalgesia of the right hind paw was measured by the digital Vonfrey analgesimeter and after the last measurement of mechanical hyperalgesia, the animals were euthanized with dose of 300 mg/kg of ketamine and 30 mg/kg of xylazine (i.p.).

2.9. Analysis of EMAS and palmatine on leukocyte viability by MTT

The MTT assay is based on the mitochondrial enzyme reduction of the tetrazolium dye to detect and determine cell viability. This assay was performed as previously described by Silva-Filho *et al.* (Silva-Filho *et al.*, 2016). The leukocytes were obtained from peritoneal

cavity of male *Swiss* mice 4 hours after intraperitoneal injection of zymosan (1 mg/cavity). The cells numbers were plated at 5×10^5 cells/well in 100 μ l RPMI medium (supplemented with 10% of fetal bovine serum (FBS) and penicillin 100 U/ml + streptomycin 100 μ g/ml) into 96-well plates. The cells were exposed to the EMAS or palmatine at concentrations of 10, 30, 90 μ g/mL, or vehicle, and incubated by 90 minutes (37 °C/5% CO₂). Then 10 μ L of MTT solution (5 mg/mL) was added to each well. After 2 hours of incubation (37 °C/5% CO₂), the supernatant was removed, and 100 μ L of DMSO was added to each well. The plate was incubated for another 10 minutes and the reading was performed by ELISA reader at 540 nm. The values of the blank wells were subtracted from each well of treated and control cells. The percentage of feasibility was determined by the following formula:

$$\% \text{ Viable cells} = \frac{(\text{Absorbance of the treated cells} - \text{Absorbance of the blank})}{(\text{Absorbance of the control} - \text{Absorbance of the blank})} \times 100$$

2.10 Statistical Analysis

Data are presented as the mean \pm standard error (SEM). Determination of significant differences among groups was performed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by a Tukey post-hoc test (GraphPad Prism Software). The percentage of inhibition was calculated from the control group. Differences were considered significant when $P < 0.05$.

3 Results

3.1 Chemical profile and analysis by ESI-MS and UHPLC-MS-MS of EMAS

The results of these analyses, presented in Table 1 and figures 1 and 2, allowed the identification, by UHPLC-ESI-MS, of the alkaloids anonaine, liriodenine, and palmatine and the isolation of the alkaloid palmatine. The phytochemical data obtained are in agreement with the chemical profile presented by the *Annona* genera and the Annonaceae family.

3.2. Effects of EMAS and palmatine on carrageenan-induced pleurisy

The groups treated with EMAS (100 and 300 mg/kg) and palmatine (1 and 3 mg/kg) inhibited the recruitment of leukocytes in pleural exudate by 74% and 81% in the case of EMAS (figure 3A), and by 50% and 75% in the case of palmatine (figure 3B) when compared to the control group. Furthermore, the groups treated with EMAS (100 and 300 mg/kg) did not differ statistically from the groups treated with the reference drug (prednisolone) and the naïve group, which, unlike the other groups, received intrapleural injection of sterile saline solution instead of carrageenan. Moreover, the analysis demonstrated that EMAS (100 and 300 mg/kg), and palmatine (1 and 3 mg/kg) showed a dose dependent effect.

The treatment with EMAS (Figure 3C) and palmatine (Figure 3D) also inhibited the nitric oxide production in pleural exudate and did not differ statistically from the groups treated with prednisolone and the naïve group, when compared to the control group. Furthermore, treatment with EMAS and palmatine did not interfere with carrageenan-induced protein extravasation (results not shown).

3.2 Effects of EMAS and palmatine on zymosan-induced joint inflammation

The prevention of the development of mechanical hyperalgesia induced by zymosan was observed at 4 and 6 h in the oral treatment with EMAS at a dose of 100 mg/kg (68 and 70%, respectively), palmatine 1 mg/kg (70 and 73%, respectively) and the reference drug prednisolone (70 and 77%, respectively) (Figure 4A and 4B). Regarding mechanical hyperalgesia, the results of the palmatine- or EMAS-treated groups showed no statistical difference from those treated with prednisolone, however all these groups differed from the control group (Figure 4A and 4B).

When compared to the control group, both palmatine (84 and 98%, respectively) and prednisolone treatment (88 and 96%, respectively) reduced knee oedema at 4 (Figure 4C) and 6 hours (Figure 4D) after intraarticular injection of zymosan. Furthermore, at 6 hours after induction of knee oedema by zymosan, treatment with EMAS significantly reduced oedema by 51%. Regarding knee oedema, the results of the palmatine- or prednisolone-treated groups showed no statistical difference between themselves, however both groups differed from the control group and the EMAS-treated group (Figure 4C and 4D).

Six hours after induction of joint inflammation by zymosan (Figure 4D), leukocyte recruitment was reduced by the treatment with EMAS (51%), palmatine (91%), and prednisolone (96%). Regarding leukocyte recruitment, the results of the groups treated with palmatine or prednisolone showed no statistical difference between themselves, however, both groups differed from the control group and the EMAS-treated group (Figure 4E).

3.4. Effects of EMAS and palmatine on formalin-induced nociception

Formalin-induced nociception was not reduced by EMAS (100mg/kg) and palmatine (1mg/kg) in the first phase (Figure 5A). In the second phase (inflammatory phase) (Figure

5B), treatment with palmatine significantly reduced the time the animals bit or licked the paw (83 %), when compared to the control group.

Furthermore, EMAS (77 %) and palmatine (80 %) redincreased the hyperalgesia threshold (Figure 5C) and reduced cold sensitivity (Figure 5D) by 74 % and 87 %, respectively, when compared to the control group. Paw oedema (Figure 5E), measured 1 hour after formalin injection, showed no effect in any of the groups tested.

3.5 Effect of palmatine on TNF-induced hyperalgesia

Intraplantar treatment of 3 µg/paw (73% and 71%) and 30 µg/paw (71% and 81%) of palmatine increased the threshold of hyperalgesia 3 and 4 hours after induction of inflammation by TNF compared to the control group (Figure 6). Furthermore, these two doses (3 and 30 µg/paw), 3 and 4 hours after TNF injection, did not statistically differ from the mechanical threshold before inflammation induction.

3.6 Effect of EMAS and palmatine on leukocyte viability by MTT

EMAS and palmatine showed no cytotoxicity *in vitro*. The cell viability of EMAS (96, 93 and 84%) and palmatine (72, 89 and 88%) at concentrations of 10, 30 and 90 µg/ml did not induce cytotoxicity.

DISCUSSION

The present research showed the antinociceptive and anti-arthritis properties of EMAS and palmatine in experimental models. The anti-inflammatory effects of *A. squamosa* were extensively explored in the literature (Hemalatha and Satyanarayana, 2009; Singh *et al.*, 2012, 2014), however rare studies of analgesic (Singh *et al.*, 2012) and anti-arthritic properties with

this plant were performed. As commented before, the leaves of *A. squamosa* are used by the population to treat body pain (Vijayakumar *et al.*, 2015; Yabesh *et al.*, 2014) and against arthritis (Quílez *et al.*, 2018). To our knowledge, this is the first study demonstrated that EMAS is effective against hyperalgesia induced by articular inflammation induced by zymosan and against hyperalgesia induced by formalin. Palmatine is an alkaloid and had a broad spectrum of pharmacological effects already described in the literature, however its antinociceptive and anti-arthritic effects have not been totally elucidated. In the present work the analgesic and anti-arthritic activities of EMAS seems to be induced by palmatine and the mechanisms of action could be related to the TNF pathway.

The carrageenan-induced pleurisy model in mice is a relevant model for studying anti-inflammatory effects of new drugs *in vivo* (Ahmad *et al.*, 2014). The pure palmatine and EMAS have been tested in pleurisy model and the analysis demonstrated that EMAS (100 and 300 mg/kg), and palmatine (1 and 3 mg/kg) acted in a dose-dependent manner in the inhibition of leukocyte migration and nitric oxide production. The ethanolic extract obtained from *A. squamosa* leaves inhibited carrageenan-induced paw oedema (Singh *et al.*, 2012), while palmatine, in an *in vitro* study, reduced the production of pro-inflammatory mediators (TNF- α , IL-1 β , IL-6 and NO) and increased the production of IL-10 (Yan *et al.*, 2017). These new results indicated that EMAS and palmatine had anti-inflammatory action in pleurisy model and showed that both products act in a dose dependent manner.

Several scientists classified the articular inflammation induced by zymosan in rodents as an arthritis model to drug discoveries (Carlos *et al.*, 2014; Guazelli *et al.*, 2018). Zymosan is obtained from *Saccharomyces cerevisiae* and is classified as an immunogenic and inflammatory agent. When zymosan is injected in the knee cavity it can induce hyperalgesia, articular oedema and the recruitment of neutrophils occur (Guazelli *et al.*, 2018) which can characterize acute knee inflammatory processes. In previous studies, palmatine demonstrated

chondroprotective action in osteoarthritis model (Zhou *et al.*, 2016). The dose of 100 mg/kg of EMAS and the dose of 1 mg/kg of palmatine were effective to inhibit mechanical hyperalgesia, leukocyte migration and oedema in zymosan articular inflammation. These results show that EMAS and palmatine had anti-arthritic potential which can explain, at least in part, the popular use of *A. squamosa* to treat arthritis.

The formalin test is a nociception model used to evaluate new products with analgesic activity in the two phases of pain: neurogenic pain, related to direct stimulation of nociceptor fibers, and inflammatory pain, which is related to inflammatory mediators (prostaglandins, bradykinin) (Hunskar and Hole, 1987). The extracts of the leaves of *A. squamosa* showed anti-nociceptive effects in acetic acid (peripheral action) and in hot plate test (central action) (Singh *et al.*, 2012) while the extract of seeds showed anti-oedematogenic effect in carrageenan-induced paw edema model (Singh *et al.*, 2012; Umamaheshwari *et al.*, 2008). Palmatine showed anti-hyperalgesic effects against diabetic neuropathy (mechanical and thermal hyperalgesia) (Shen *et al.*, 2018) and trigeminal neuralgia models (mechanical hyperalgesia) in rats (He *et al.*, 2020). Our results showed that EMAS (100 mg/kg) and palmatine (1 mg/kg) did not present activity in the first phase (Figure 5A), however, in the second phase (inflammatory phase) (Figure 5B), the nociception was antagonized by palmatine. Furthermore, EMAS and palmatine prevented the mechanical hyperalgesia (Figure 5C) and cold sensitivity (Figure 5D). The present study was the first to show the palmatine anti-nociceptive properties in formalin model, which could explain, partially, the analgesic popular use of *A. squamosa*.

The extract was chemically analyzed and revealed the presence of palmatine, liriodenine and anonaine. Palmatine is an alkaloid present in several medicinal plants and has a broad spectrum of pharmacological effects already described in the literature (Long *et al.*, 2019), including the anticancer effect (Hambricht *et al.*, 2015; Ali and Dixit, 2013),

antioxidant (Chaves *et al.*, 2020; Okechukwu *et al.*, 2021), anti-inflammatory (Yan *et al.*, 2017; Zhou *et al.*, 2016), neuroprotective (Chaves *et al.*, 2020; Haj *et al.*, 2018; Tang *et al.*, 2021), antibacterial (Kim *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2017), antiviral (Ho *et al.*, 2019; Kim *et al.*, 2014) and as a hypolipidemic (He *et al.*, 2016; Ning *et al.*, 2015). Previous studies have demonstrated the anti-inflammatory action of liriodenin. Liriodenine reduced NO production by macrophages obtained from lipopolysaccharide (LPS)-induced peritonitis in rats (Yang *et al.*, 2015), interacted with the COX-2 binding site, inhibiting COX-2 *in silico* (Anita *et al.*, 2019), decreased cell proliferation in rat synovial cavity and reduced splenocyte proliferation *in vitro* (Yang *et al.*, 2015). The Anonaine was not investigated in to relation to inflammation or pain action. The effective dose of EMAS was 100 mg/kg and the dose of 1 mg/kg of palmatine was selected to be tested, in zymosan and formalin models, since the palmatine comprises about 1 % of EMAS. Both EMAS (100 mg/kg) and palmatine (1 mg/kg) have efficacy in all models tested in the present work. The present study was the first to show that palmatine is the main compound found in EMAS responsible for anti-nociceptive and anti-arthritic effects.

Considering the effects of palmatine against pain and inflammation, this study evaluated the involvement of the TNF pathway in the antihyperalgesic action of this substance. TNF is a potent pro-inflammatory cytokine, which plays an important role in pathological spinal pain (Liu *et al.*, 2007; Schäfers *et al.*, 2003). This cytokine acts as a neuromodulator in the dorsal horn of the spinal cord (Liu *et al.*, 2007) and regulates both inflammatory and neuropathic pain (Park *et al.*, 2011; Schäfers *et al.*, 2003; Xu *et al.*, 2006).

In this study, palmatine was observed to inhibit TNF-induced mechanical hyperalgesia, which corroborates with previous studies, that showed palmatine antagonized TNF- α and IL-1 β in neuropathy models (Shen *et al.*, 2018; He *et al.*, 2020). The antihyperalgesic effect of palmatine was associated with up-regulation of calcitonin gene-

related peptide (CGRP) expression, a neurotransmitter with an important role in pain transmission (He *et al.*, 2020). In diabetic neuropathy, in turn, palmatine decreased phosphorylation of the ERK1/2 pathway, which contributed to a reduction in the expression of P2X7, a receptor with an important role in the development of pain and depression (Shen *et al.*, 2018). Palmatine showed efficacy on the TNF model, however the result of this test did not discard that palmatine antagonize other inflammatory/nociceptive pathways.

Taking into consideration the role of leukocytes in the regulation of inflammation and, consequently, inflammatory pain, the viability of leukocytes treated with palmatine and EMAS was evaluated by the *in vitro* MTT test. Although it did not show cytotoxicity, it is interesting to comment that studies linking palmatine with the induction of DNA alteration were published (Long *et al.*, 2019). In addition, palmatine has a complex effect on metabolic enzymes in the liver, with glucuronidation and sulfation being the main metabolic pathways.

Considering the popular use of EMAS in pain and arthritis treatments, the proven pharmacological effects of EMAS and palmatine on pain and inflammation, one of the mechanisms of action of *A. squamosa*, may be the TNF pathway.

States contribution of authors

CNAI, ES, ACA and CALK performed the anti-inflammatory and analgesic evaluation. SES-F, CNMI, ES, ARA and CALK performed the leukocyte viability by MTT test, *in vitro*. MJS, TFP and CCL prepared the methanolic extract (EMAS), performed the HPLC-UV/DAD-ESI/MS analysis and isolated palmatine from *Annona squamosa* leaves. MJS, CNAI and CALK ensured statistical analysis, wrote, and corrected the manuscript.

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflicts of interest in this work.

Acknowledgments

The authors would like to thank Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Mato Grosso do Sul (FUNDECT), and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES).

Funding Body information

The authors are thankful to CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Finance Code 001), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, #311166/2016-4; #427859/2018-2; #309411/2019-0), FAEPEX-UNICAMP and FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, Process number 2006/06079-4, 2010/00889-0, 2011/18315-2, 2012/09101-1, 2014/09980-0 and 2015/03726-8) for the financial support.

References

- Abe, R., Ohtani, K., 2013. An ethnobotanical study of medicinal plants and traditional therapies on Batan Island, the Philippines. *J Ethnopharmacol* 145, 554–565. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.11.029>
- Ahmad, S.F., Zoheir, K.M.A., Abdel-Hamied, H.E., Alrashidi, I., Attia, S.M., Bakheet, S.A., Ashour, A.E., Abd-Allah, A.R.A., 2014. Role of a histamine 4 receptor as an anti-inflammatory target in carrageenan-induced pleurisy in mice. *Immunology* 142, 374–383. <https://doi.org/10.1111/imm.12257>
- Ali, H., Dixit, S., 2013. Extraction optimization of *Tinospora cordifolia* and assessment of the anticancer activity of its alkaloid palmatine. *ScientificWorldJournal* 2013, 376216. <https://doi.org/10.1155/2013/376216>
- Anita, T.Z., Mahdi, C., Beltran, M.A.G., Aulanni'am, A., 2019. Identification and molecular docking analysis alkaloids *Polyalthia longifolia* leaves from Indonesia and the Philippines as anti-inflammatory. *Journal of Physics: Conference Series* 1374.
- Aquino, D.F., Piccinelli, A.C., Soares, F.L.P., Arena, A.C., Salvador, M.J., Kassuya, C.A.L., 2015. Anti-hyperalgesic and Anti-inflammatory Activity of *Alternanthera Maritima*

- Extract and 2''-O- α -L-rhamnopyranosylvitexin in Mice. *Inflammation* 38, 2057–2066. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0187-0>
- Arthur, J., Bruera, E., 2019. Balancing opioid analgesia with the risk of nonmedical opioid use in patients with cancer. *Nat Rev Clin Oncol* 16, 213–226. <https://doi.org/10.1038/s41571-018-0143-7>
- Baral, P., Udit, S., Chiu, I.M., 2019. Pain and immunity: implications for host defence. *Nat Rev Immunol* 19, 433–447. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0147-2>
- Barnes, P.J., Adcock, I.M., 2009. Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 373, 1905–1917. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(09\)60326-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(09)60326-3)
- Bertin, C., Delage, N., Rolland, B., Pennel, L., Fatseas, M., Trouvin, A.-P., Delorme, J., Chenaf, C., Authier, N., 2021. Analgesic opioid use disorders in patients with chronic non-cancer pain: A holistic approach for tailored management. *Neurosci Biobehav Rev* 121, 160–174. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.12.015>
- Carlos, F.P., de Paula Alves da Silva, M., de Lemos Vasconcelos Silva Melo, E., Costa, M.S., Zamuner, S.R., 2014. Protective effect of low-level laser therapy (LLLT) on acute zymosan-induced arthritis. *Lasers Med Sci* 29, 757–763. <https://doi.org/10.1007/s10103-013-1413-3>
- Chavan, M.J., Wakte, P.S., Shinde, D.B., 2010. Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from *Annona squamosa* L. bark. *Phytomedicine* 17, 149–151. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.05.016>
- Chaves, S.K.M., Afzal, M.I., Islam, M.T., Hameed, A., Da Mata, A.M.O.F., Da Silva Araújo, L., Ali, S.W., Rolim, H.M.L., De Medeiros, M. das G.F., Costa, E.V., Salehi, B., Martins, N., Arif, A.M., Imran, M., Sharifi-Rad, J., Melo-Cavalcante, A.A. de C., Feitosa, C.M., 2020. Palmatine antioxidant and anti-acetylcholinesterase activities: A pre-clinical assessment. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* 66, 54–59.
- Chinnasamy, P., Arumugam, R., Ariyan, S., 2019. In silico validation of the indigenous knowledge of the herbal medicines among tribal communities in Sathyamangalam wildlife sanctuary, India. *Journal of Traditional and Complementary Medicine* 9, 143–155.
- Costa, E.V., Pinheiro, M.L.B., Barison, A., Campos, F.R., Salvador, M.J., Maia, B.H.L.N.S., Cabral, E.C., Eberlin, M.N., 2010. Alkaloids from the Bark of *Guatteria hispida* and Their Evaluation as Antioxidant and Antimicrobial Agents. *J. Nat. Prod.* 73, 1180–1183. <https://doi.org/10.1021/np100013r>
- Furman, D., Campisi, J., Verdin, E., Carrera-Bastos, P., Targ, S., Franceschi, C., Ferrucci, L., Gilroy, D.W., Fasano, A., Miller, G.W., Miller, A.H., Mantovani, A., Weyand, C.M., Barzilai, N., Goronzy, J.J., Rando, T.A., Effros, R.B., Lucia, A., Kleinstreuer, N., Slavich, G.M., 2019. Chronic inflammation in the etiology of disease across the life span. *Nat Med* 25, 1822–1832. <https://doi.org/10.1038/s41591-019-0675-0>
- Guazelli, C.F.S., Staurengo-Ferrari, L., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Ruiz-Miyazawa, K.W., Vicentini, F.T.M.C., Vignoli, J.A., Camilios-Neto, D., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Casagrande, R., Verri, W.A., 2018. Quercetin attenuates zymosan-induced

- arthritis in mice. *Biomed Pharmacother* 102, 175–184. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.03.057>
- Haj, E., Losev, Y., Guru KrishnaKumar, V., Pichinuk, E., Engel, H., Raveh, A., Gazit, E., Segal, D., 2018. Integrating *in vitro* and *in silico* approaches to evaluate the “dual functionality” of palmatine chloride in inhibiting and disassembling Tau-derived VQIVYK peptide fibrils. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862, 1565–1575. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2018.04.001>
- Hambright, H.G., Batth, I.S., Xie, J., Ghosh, R., Kumar, A.P., 2015. Palmatine inhibits growth and invasion in prostate cancer cell: Potential role for pS6/NFκB/FLIP. *Mol Carcinog* 54, 1227–1234. <https://doi.org/10.1002/mc.22192>
- He, K., Kou, S., Zou, Z., Hu, Y., Feng, M., Han, B., Li, X., Ye, X., 2016. Hypolipidemic Effects of Alkaloids from *Rhizoma Coptidis* in Diet-Induced Hyperlipidemic Hamsters. *Planta Med* 82, 690–697. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1568261>
- He, L., Liu, L., Guan, S., Zheng, X., Ge, H., Yin, C., Shen, Y., Tan, M., Wang, C., Gao, Y., Xiong, W., 2020. Palmatine alleviates hyperalgesia by inhibiting the expression of calcitonin gene-related peptide in the trigeminal ganglion of rats with chronic constriction injury of the infraorbital nerve. *Br J Oral Maxillofac Surg* 58, 443–450. <https://doi.org/10.1016/j.bjoms.2020.01.031>
- Hemalatha, K., Satyanarayana, D., 2009. Anti-inflammatory activity of *Annona squamosa* Linn. *Biomedical and Pharmacology Journal* 17–20.
- Ho, Y.-J., Lu, J.-W., Huang, Y.-L., Lai, Z.-Z., 2019. Palmatine inhibits Zika virus infection by disrupting virus binding, entry, and stability. *Biochem Biophys Res Commun* 518, 732–738. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2019.08.120>
- Hunskar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 30, 103–114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1)
- Kim, J.H., Ryu, Y.B., Lee, W.S., Kim, Y.H., 2014. Neuraminidase inhibitory activities of quaternary isoquinoline alkaloids from *Corydalis turtschaninovii* rhizome. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 6047–6052. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2014.09.004>
- Leitão, M.M., Radai, J.A.S., Ferrari, I.C., Negrão, F.J., Silva-Filho, S.E., Oliveira, R.J., Mota, J. da S., Kassuya, C.A.L., 2020. Effects of an ethanolic extract and fractions from *Piper glabratum* (Piperaceae) leaves on pain and inflammation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 117, 104762. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2020.104762>
- Li, D.-L., Xing, F.-W., 2016. Ethnobotanical study on medicinal plants used by local Hoklos people on Hainan Island, China. *J Ethnopharmacol* 194, 358–368. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.07.050>
- Liu, Y.-L., Zhou, L.-J., Hu, N.-W., Xu, J.-T., Wu, C.-Y., Zhang, T., Li, Y.-Y., Liu, X.-G., 2007. Tumor necrosis factor- α induces long-term potentiation of C-fiber evoked field potentials in spinal dorsal horn in rats with nerve injury: the role of NF- κ B, JNK and p38 MAPK. *Neuropharmacology* 52, 708–715. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2006.09.011>

- Long, J., Song, J., Zhong, L., Liao, Y., Liu, L., Li, X., 2019. Palmatine: A review of its pharmacology, toxicity and pharmacokinetics. *Biochimie* 162, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.04.008>
- Longuefosse, J.L., Nossin, E., 1996. Medical ethnobotany survey in Martinique. *J Ethnopharmacol* 53, 117–142. [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(96\)01425-0](https://doi.org/10.1016/0378-8741(96)01425-0)
- Ning, N., He, K., Wang, Y., Zou, Z., Wu, H., Li, X., Ye, X., 2015. Hypolipidemic Effect and Mechanism of Palmatine from *Coptis chinensis* in Hamsters Fed High-Fat diet. *Phytother Res* 29, 668–673. <https://doi.org/10.1002/ptr.5295>
- Okechukwu, P.N., Ekeuku, S.O., Chan, H.K., Eluri, K., Froemming, G.R.A., 2021. Palmatine Inhibits Up-Regulation of GRP78 and CALR Protein in an STZ-Induced Diabetic Rat Model. *Curr Pharm Biotechnol* 22, 288–298. <https://doi.org/10.2174/1389201021666200730124208>
- Ong, H.G., Kim, Y.-D., 2014. Quantitative ethnobotanical study of the medicinal plants used by the Ati Negrito indigenous group in Guimaras island, Philippines. *J Ethnopharmacol* 157, 228–242. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.09.015>
- Park, C.-K., Lü, N., Xu, Z.-Z., Liu, T., Serhan, C.N., Ji, R.-R., 2011. Resolving TRPV1- and TNF- α -mediated spinal cord synaptic plasticity and inflammatory pain with neuroprotectin D1. *J Neurosci* 31, 15072–15085. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2443-11.2011>
- Penido, C., Conte, F.P., Chagas, M.S.S., Rodrigues, C. a. B., Pereira, J.F.G., Henriques, M.G.M.O., 2006. Antiinflammatory effects of natural tetranortriterpenoids isolated from *Carapa guianensis* Aublet on zymosan-induced arthritis in mice. *Inflamm Res* 55, 457–464. <https://doi.org/10.1007/s00011-006-5161-8>
- Quatrini, L., Ugolini, S., 2020. New insights into the cell- and tissue-specificity of glucocorticoid actions. *Cell Mol Immunol* 1–10. <https://doi.org/10.1038/s41423-020-00526-2>
- Quílez, A.M., Fernández-Arche, M.A., García-Giménez, M.D., De la Puerta, R., 2018. Potential therapeutic applications of the genus *Annona*: Local and traditional uses and pharmacology. *J Ethnopharmacol* 225, 244–270. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.014>
- Ronchetti, S., Migliorati, G., Delfino, D.V., 2017. Association of inflammatory mediators with pain perception. *Biomed Pharmacother* 96, 1445–1452. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.001>
- Schäfers, M., Svensson, C.I., Sommer, C., Sorkin, L.S., 2003. Tumor Necrosis Factor- α Induces Mechanical Allodynia after Spinal Nerve Ligation by Activation of p38 MAPK in Primary Sensory Neurons. *J Neurosci* 23, 2517–2521. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-07-02517.2003>
- Shen, Y., Guan, S., Ge, H., Xiong, W., He, L., Liu, L., Yin, C., Liu, H., Li, Guilin, Xu, C., Xu, H., Liu, S., Li, Guodong, Liang, S., Gao, Y., 2018. Effects of palmatine on rats with comorbidity of diabetic neuropathic pain and depression. *Brain Research Bulletin* 139, 56–66. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2018.02.005>

- Silva-Filho, S.E., Wiirzler, L.A.M., Cavalcante, H.A.O., Uchida, N.S., de Souza Silva-Comar, F.M., Cardia, G.F.E., da Silva, E.L., Aguiar, R.P., Bersani-Amado, C.A., Cuman, R.K.N., 2016. Effect of patchouli (*Pogostemon cablin*) essential oil on *in vitro* and *in vivo* leukocytes behavior in acute inflammatory response. *Biomedicine & Pharmacotherapy* 84, 1697–1704. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.10.084>
- Singh, D., Mishra, B., Mishra, R., 2012. Anti-nociceptive and Anti-inflammatory Activity of *Annona squamosa* L. Leaf Extract in Mice and Rats. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*.
- Singh, T.P., Singh, R.K., Malik, P., 2014. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Annona squamosa* Linn bark. *Journal of Scientific and Innovative Research* 3, 60–64.
- Tang, C., Hong, J., Hu, C., Huang, C., Gao, J., Huang, J., Wang, D., Geng, Q., Dong, Y., 2021. Palmatine Protects against Cerebral Ischemia/Reperfusion Injury by Activation of the AMPK/Nrf2 Pathway. *Oxid Med Cell Longev* 2021, 6660193. <https://doi.org/10.1155/2021/6660193>
- Umamaheshwari, A., Arunkumar, A., Vedhahari, B.N., Suryaprabha, D., Punitha, S., 2008. Phytochemical Evaluation and Antinflammatory Activity of Seed Extract of *Annona Squamosa*. *International Journal of Chemical Sciences* 6, 1594–1599.
- Vijayakumar, S., Morvin Yabesh, J.E., Prabhu, S., Manikandan, R., Muralidharan, B., 2015. Quantitative ethnomedicinal study of plants used in the Nelliampathy hills of Kerala, India. *Journal of Ethnopharmacology* 161, 238–254. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.12.006>
- Wang, L., Wang, X., Zhang, S.-L., Zhu, X.-M., Liu, Y.-Q., Song, Z.-J., Du, W.-J., Ji, J., Cui, C.-L., He, X., Zhang, C.-F., Guo, C.-R., Wang, C.-Z., Yuan, C.-S., 2017. Gastroprotective effect of palmatine against acetic acid-induced gastric ulcers in rats. *J Nat Med* 71, 257–264. <https://doi.org/10.1007/s11418-016-1057-2>
- Xu, J.-T., Xin, W.-J., Zang, Y., Wu, C.-Y., Liu, X.-G., 2006. The role of tumor necrosis factor- α in the neuropathic pain induced by Lumbar 5 ventral root transection in rat. *Pain* 123, 306–321. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2006.03.011>
- Yabesh, J.E.M., Prabhu, S., Vijayakumar, S., 2014. An ethnobotanical study of medicinal plants used by traditional healers in silent valley of Kerala, India. *J Ethnopharmacol* 154, 774–789. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.004>
- Yan, B., Wang, D., Dong, S., Cheng, Z., Na, L., Sang, M., Yang, H., Yang, Z., Zhang, S., Yan, Z., 2017. Palmatine inhibits TRIF-dependent NF- κ B pathway against inflammation induced by LPS in goat endometrial epithelial cells. *Int Immunopharmacol* 45, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.02.004>
- Yang, N., Wang, L., Zhang, Y., 2015. Immunological Activities of Components from Leaves of *Liriodendron chinensis*. *Chinese Herbal Medicines* 7, 279–282. [https://doi.org/10.1016/S1674-6384\(15\)60051-X](https://doi.org/10.1016/S1674-6384(15)60051-X)
- Zhou, J.-T., Li, C.-L., Tan, L.-H., Xu, Y.-F., Liu, Y.-H., Mo, Z.-Z., Dou, Y.-X., Su, R., Su, Z.-R., Huang, P., Xie, J.-H., 2017. Inhibition of *Helicobacter pylori* and Its Associated

Urease by Palmatine: Investigation on the Potential Mechanism. PLoS One 12, e0168944. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168944>

Zhou, X., Lin, X., Xiong, Y., Jiang, L., Li, W., Li, J., Wu, L., 2016. Chondroprotective effects of palmatine on osteoarthritis *in vivo* and *in vitro*: A possible mechanism of inhibiting the Wnt/ β -catenin and Hedgehog signaling pathways. International Immunopharmacology 34, 129–138. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2016.02.029>

Legends to table and Figures

Table 1. UHPLC-MS analysis of alkaloids (confirmed by the comparison with standard sample) in the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS).

Figure 1. UHPLC-MS chromatogram of the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS) with some identified alkaloids.

Figure 2. ESI(+)-MS/MS. Fragmentation of the alkaloid palmatine (m/z 352) isolated from the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS).

Figure 3. Effects of oral administration of EMAS and palmatine on leukocyte migration (A, B) and nitric oxide production (C, D) in pleurisy model induced by carrageenan. The animals received, by gavage, EMAS (30, 100, 300 mg/kg), palmatine (0.3, 1, 3 mg/kg), vehicle (naïve and control groups) or prednisolone (PRED, 3 mg/kg) and, after 1 hour, an intrathoracic injection of carrageenan was given to groups except the naïve group which as treated with an intrathoracic injection of 0.9% of saline. Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. The letters a, b and c indicate significant differences among groups according to Tukey's multiple comparison test.

Figure 4. Effects of oral administration of EMAS and palmatine on mechanical hyperalgesia (A) (B), knee oedema (C) (D) and on leukocyte migration (E) caused by Zymosan-induced joint inflammation in female mice (n=6). The animals received, by gavage, EMAS (100 mg/kg), palmatine (1 mg/kg), saline (control group) or the reference drug prednisolone (PRED, 3 mg/kg) and, after 1 hour, 200 μ g of zymosan was injected into the left knee. After induction of inflammation, mechanical hyperalgesia and oedema were measured, four (A) (C) and six (B) (D) hours later, respectively. After that, the animals were euthanized and the joint exudate was used to assess leukocyte migration analysis 6 hours after zymosan injection (E). Each bar represents the mean \pm SEM of 6 animals. The letters a, b, and c indicate significant differences among groups according to Tukey's multiple comparison test.

Figure 5. Effects of oral administration of EMAS and palmatine on formalin test. One hour before applying 30 μ L of 1% formalin, the animals were orally treated with EMAS (100 mg/kg), palmatine (PALM 1mg/kg) or vehicle (control group). The first phase two figures represent the nociceptive behavior (paw licking and biting) in the first five minutes after formaldehyde application, neurogenic phase (A), and 15 to 30 minutes later, inflammatory phase (B). The paw withdrawal threshold (Von Frey test) (C) and cold sensitivity (D) were performed immediately after the formalin test. Formalin-induced oedema was measured one hour after formalin application (E). Each bar represents the mean \pm SEM of 5 animals. The letters a and b indicate significant differences between groups according to Tukey's multiple comparison test.

Figure 6. Effects of intraplantar administration of palmatine on TNF-induced mechanical hyperalgesia. One hour before the injection of 20 μ L of TNF- α into the right hind paw, animals were treated with saline or palmatine (PALM 3 and 30 μ g/paw) intraplantarly in the same region as the inducing agent. Three and four hours after TNF injection, the hyperalgesia threshold (Von Frey test) was analyzed. In addition, the normal (basal) mechanical pain threshold was performed before treating the animals. Each bar represents the mean \pm SEM of 5 animals. The letters a and b indicate significant differences among groups according to Tukey's multiple comparison test.

Table 1. UHPLC-MS analysis of alkaloids (confirmed by the comparison with standard sample) in the methanolic extract of *A. squamosa* leaves (EMAS).

Analyzed compounds	[M+H] ⁺ (<i>m/z</i>)	Retention time (min)	EMAS
Anonaine	266	2.86	+
Asimilobine	268	2.19	-
Liriodenine	276	3.00	+
Lysicamine	292	3.63	-
Isomoschatoline	308	4.01	-
O-methyl-isomoschatoline	322	4.45	-
Coreximine	328	1.36	-
Isocoreximine	328	1.36	-
Reticuline	330	1.61	-
9-Methoxy-isomoscatoline	338	4.18	-
Palmatine	353	2.44	+

+: compound detected; -: compound not detected

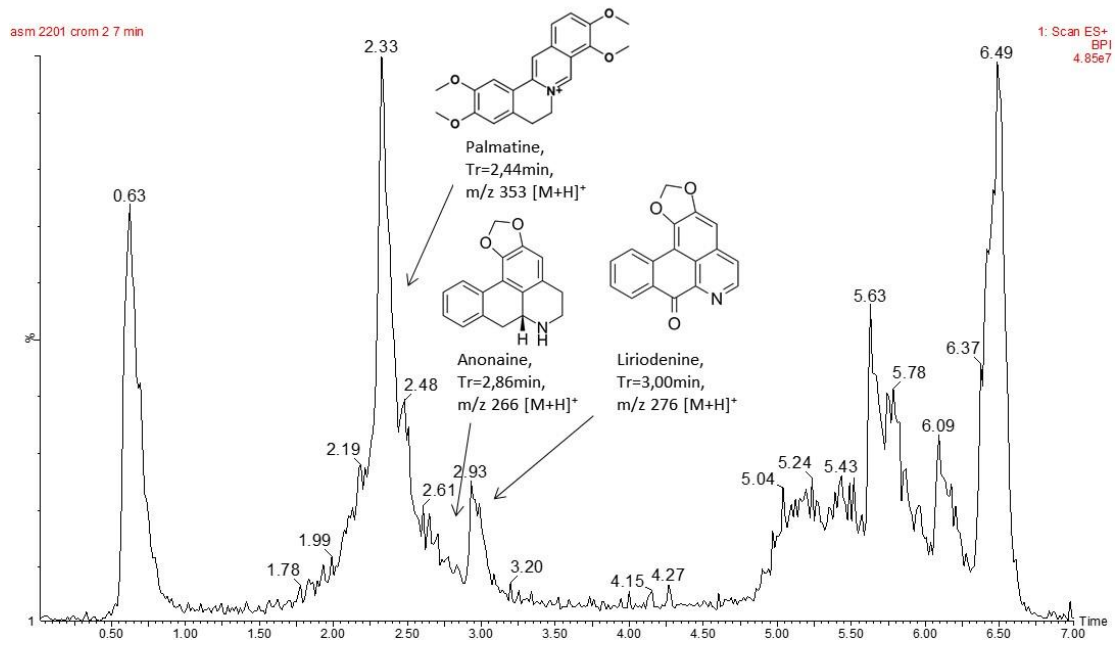


Figure 1. Ito *et al.*, 2021.

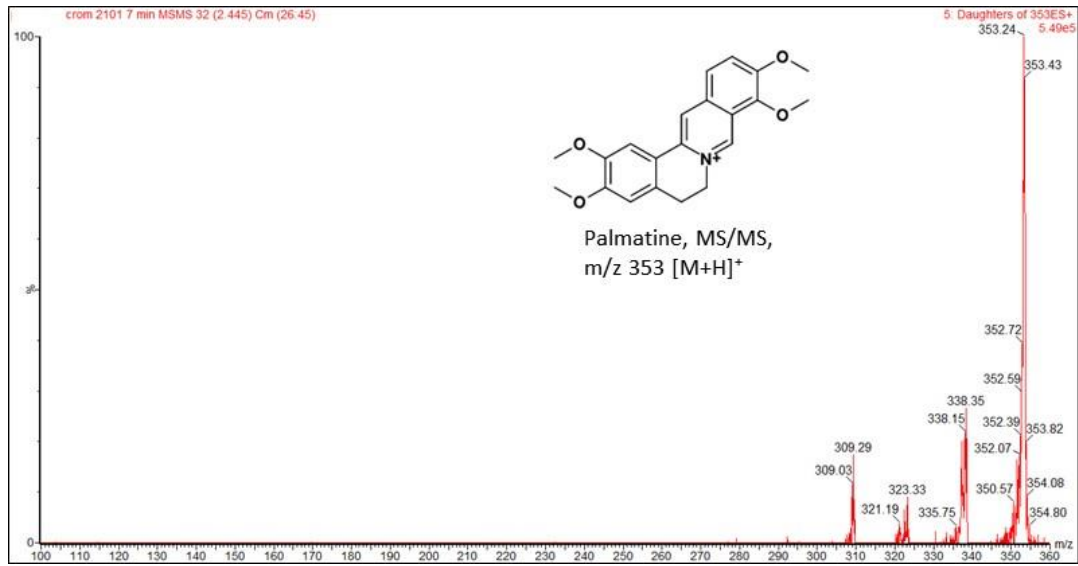


Figure 2. Ito *et al.*, 2021.

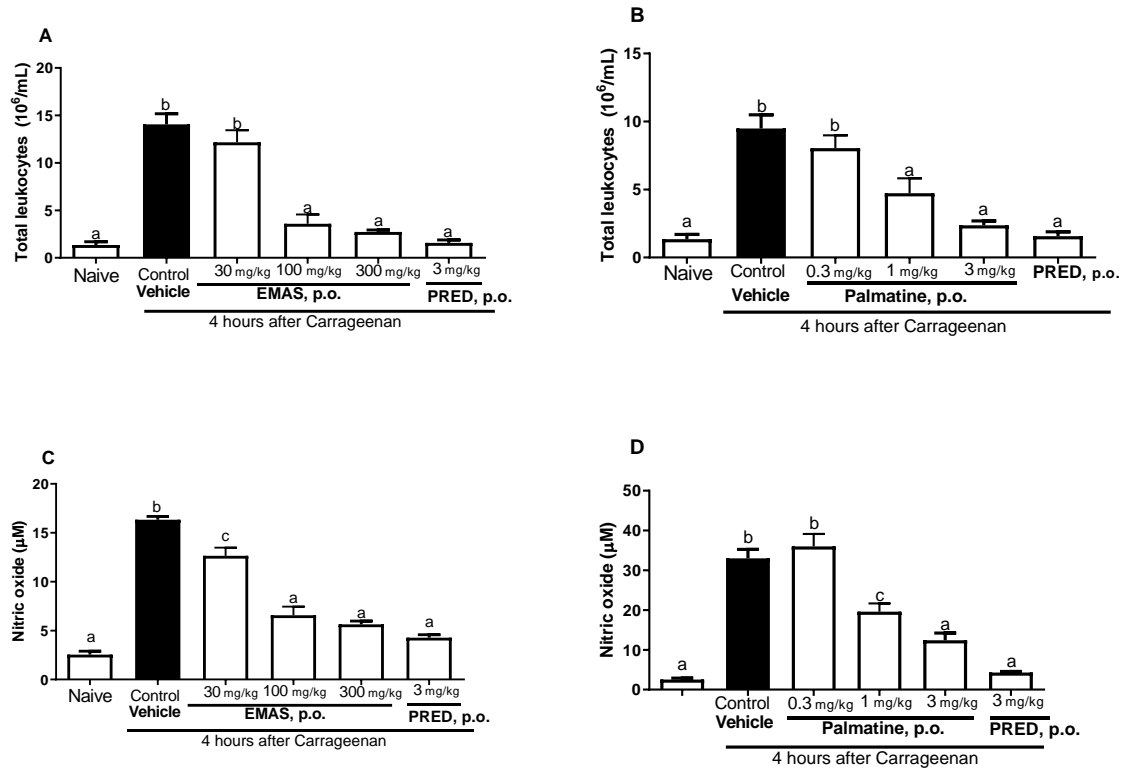


Figure 3. Ito *et al.*, 2021.

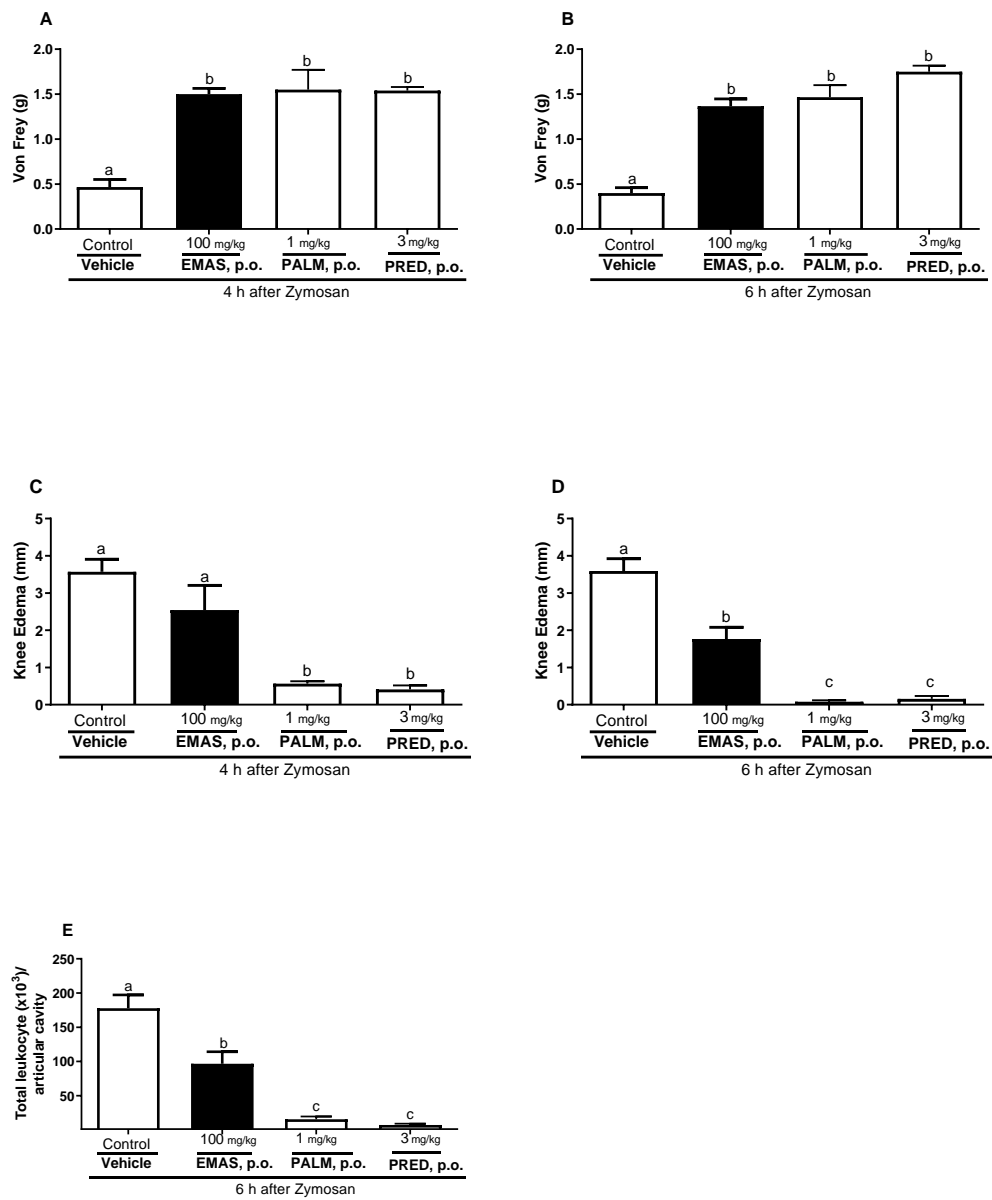


Figure 4. Ito *et al.*, 2021.

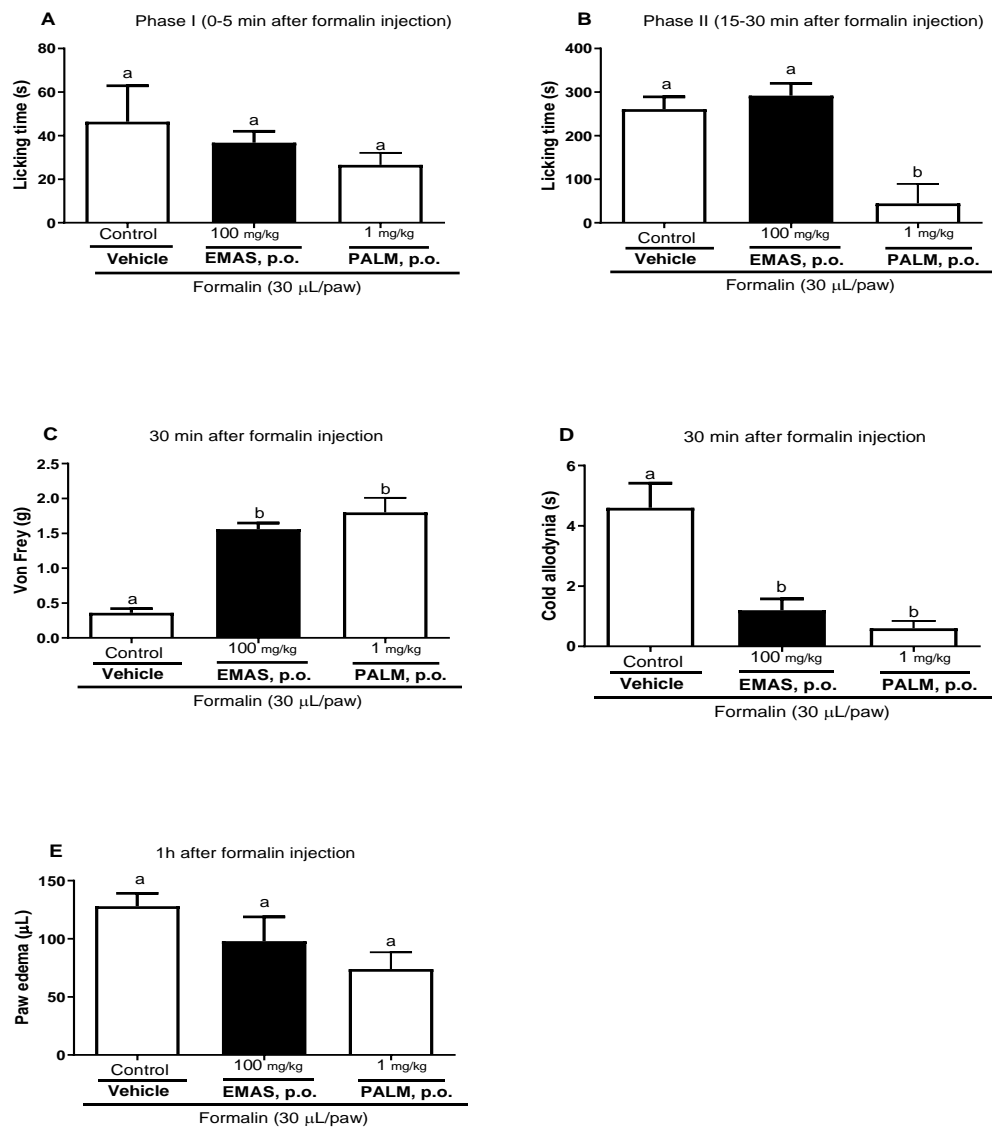


Figure 5. Ito *et al.*, 2021.

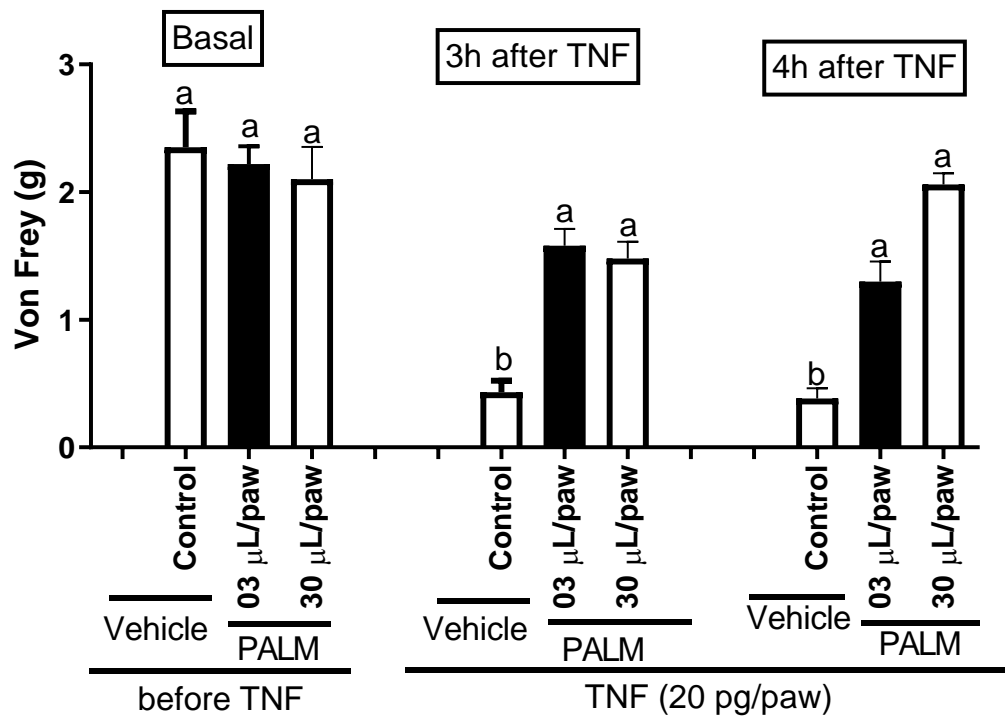


Figure 6. Ito *et al.*, 2021.

6 CONCLUSÕES

Este estudo demonstra o potencial antinociceptivo (apenas na palmatina), analgésico e/ou anti-hiperalgésica e anti-inflamatório do extrato metanólico das folhas de *A. squamosa* e do seu composto isolado (palmatina), o que pode explicar, em parte, o uso popular dessa planta como agente natural contra a dor e a inflamação. Além disso, ambas não apresentaram ação citotóxica sobre os leucócitos *in vitro*.

Considerando isso, palmatina poderia ser um dos responsáveis pelas propriedades anti-hiperalgésica dessa planta, sendo um dos possíveis mecanismos de ação, a inibição da via TNF. É interessante comentar, também, que o projeto pela qual foi desenvolvido esta dissertação possui mais testes farmacológicos e toxicológicos que serão realizados posteriormente.

7 ANEXOS

7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA

Dourados-MS, 04/08/2021.

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Atividade farmacológica e toxicológica de *Annona cacans* e *A. squamosa***", registrada sob o protocolo de nº 13/2020, sob a responsabilidade de *Cândida Aparecida Leite Kassuya* e *Caren Naomi Agüero Ito* – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 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 da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal Da Grande Dourados, em reunião de 19/06/2020.

<i>Finalidade</i>	() Ensino (X) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	20/08/2020 a 20/02/2023
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus</i> - Ratos Wistar <i>Mus musculus</i> – Camundongos Swiss
<i>Nº de animais</i>	420 - 208 ratos e 212 camundongos
<i>Peso/idade</i>	Ratos – 6 semanas Camundongos – 6 semanas
<i>Sexo</i>	Ratos – 118 machos e 90 fêmeas Camundongos – 116 machos e 96 fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério Central UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA



Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A498163

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A498163**
 Usuário: **UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS**
 CPF/CNPJ: **07.775.847/0001-97**
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

Annona Annona squamosa

Título da Atividade: **Atividade farmacológica e toxicológica de Annona cacans e A. squamosa**

Equipe

Caren Naomi Agüero Ito	UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
Candida Aparecida Leite Kassuya	Universidade Federal da Grande Dourados
Marcos José Salvador	Universidade Estadual de Campinas

Parceiras Nacionais

46.068.425/0001-33 / Universidade Estadual de Campinas

Data do Cadastro: **30/05/2021 17:35:44**

Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **17:38** de **30/05/2021**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL
 ASSOCIADO - **SISGEN**