

**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.



UFGRD

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/UFGRD (presidente), Dr. Luis Fernando Benitez Macorini/UNIGRAN e Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFGRD. 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/UFGRD n. 200, de 16/03/2020 e a Instrução Normativa PROPP/UFGRD 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/UFGRD
Dr. Luis Fernando Benitez Macorini/UNIGRAN (participação remota)
Dr. Marcio Eduardo de Barros - PPGCS/UFGRD (participação remota)

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

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, liriidenina 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 pg/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 μ g/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 pg/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.