



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR

WELLINGTON JUNIOR TAISHO NAGAHAMA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E
DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS
DE *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott**

BELÉM - PA

2024

WELLINGTON JUNIOR TAISHO NAGAHAMA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E
DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS
DE *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos.

Coorientadora: Dr^a. Cristine Bastos do Amarante.

BELÉM - PA

2024

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)**

C837c Costa, Wellington Junior Taisho Nagahama.
Caracterização química, avaliação da toxicidade oral aguda e da
atividade antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de
Montrichardia linifera (Arruda) Schott / Wellington Junior Taisho
Nagahama Costa. — 2024.
51 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Coorientação: Prof^a. Dra. Cristine Bastos do Amarante
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em
Neurociências e Biologia celular, Belém, 2024.

1. Atividade antinociceptiva. 2. Flavonoide. 3.
Montrichardia linifera. 4. Planta medicinal. 5. Toxicidade oral
aguda. I. Título.

CDD 571.6

WELLINGTON JUNIOR TAISHO NAGAHAMA COSTA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E
DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS
DE *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Neurociências e Biologia Celular da Universidade Federal do Pará, como requisito para obtenção do título de Mestre em Neurociências e Biologia Celular.

Orientadora: Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos.

Coorientadora: Dr. Cristine Bastos do Amarante.

Data da aprovação: ___/___/___

Conceito:

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará
Presidente da Banca Examinadora – Orientadora

Prof^a. Dr^a. Cristine Bastos do Amarante
Coordenação de Ciências da Terra e Ecologia, Museu Paraense Emílio Goeldi
Coorientadora

Prof^a. Dr. Anderson Manoel Herculano Oliveira da Silva
Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará
Membro Interno

Prof. Dr. Anderson Bentes de Lima
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade do Estado do Pará
Membro Externo

Dedico este trabalho aos meus pais e a minha namorada, por todo incentivo, apoio e amor para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a minha orientadora Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos pela oportunidade de ser seu aluno de mestrado. No início foram tantas incertezas e inseguranças, mas ao decorrer do processo, percebi que ela planejou silenciosamente toda a minha trajetória até o presente momento. Não tenho palavras para descrever sua tamanha bondade e sabedoria, obrigado por ser essa pessoa tão maravilhosa. Com certeza estaremos juntos no doutorado!

Agradeço a profa. Dra. Cristine Bastos do Amarante, do Laboratório de Análises Químicas, por essa trajetória no mestrado, pela parceria valiosa com o nosso laboratório e por suas atribuições ao projeto. Obrigado por sempre me incentivar e apoiar!

Agradeço ao prof. Dr. Anderson Bentes de Lima, do Laboratório de Morfofisiologia Aplicada à Saúde, por estar nesta trajetória do mestrado, por todos os seus ensinamentos e suas atribuições científicas. Desde a graduação sempre me instigou a pensar, a pesquisar e escrever. Obrigado por tudo!

Agradeço ao prof. Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro, do Laboratório Central de Extração, pela sua parceria, suas atribuições agregam a este trabalho e em minha formação como cientista.

Agradeço as amigas do Laboratório de Neuroinflamação (LNI): Prof. Paulo, Bruno, Dayane, Klinsmann, Ludmila, Marcos, Ramon e Vinícius (que atualmente reside no Japão). Obrigado pelo convívio, pelas experiências, pelas conversas e pelos conselhos da vida.

Agradeço a Pós-Graduação de Neurociências e Biologia Celular por todo o aprendizado e por me proporcionar a obtenção do título de mestre.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro durante o período do mestrado e que também tornou possível a conclusão deste trabalho de pesquisa.

Agradeço a todos que contribuíram direta ou indiretamente para o fechamento de mais um ciclo.

Inteligência é a habilidade de se adaptar às mudanças (Stephen Hawking).

RESUMO

Introdução: *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott é popularmente conhecida como “aninga”, “aningaçu”, “aningaíba” e “aninga-do-igapó”. As compressas e emplastros das folhas são da planta medicinal utilizados para tratar abscessos, tumores e dores causadas por ferroada de araias. **Objetivo:** O estudo teve como objetivo investigar o potencial antinociceptivo do extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera* (EMFML), bem como realizar a caracterização química e toxicidade oral aguda. **Material e métodos:** As folhas foram coletadas durante a estação chuvosa e o extrato metanólico foi obtido após extração em gradiente em diferentes solventes. O EMFML foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e ressonância magnética nuclear (RMN). A avaliação do teste de toxicidade oral aguda foi utilizada para observar a presença de substâncias tóxicas. Posteriormente, foram utilizados os testes de ácido acético, placa quente e formalina para avaliar os efeitos analgésicos. **Resultados:** A análise do CLAE *fingerprint* permitiu a identificação de rutina, quercetina e epicatequina. A análise dos espectros de RMN identificou rutina e quercetina, bem como os flavonoides luteolina e crisoeriol. O EMFML não demonstrou efeitos considerados tóxicos. No teste do ácido acético, o EMFML inibiu a dor periférica em 51,46% ($p < 0,05$) na dose de 50 mg/kg e 75,08% ($p < 0,001$) na dose de 100 mg/kg. O teste da placa quente avaliou o tempo de latência dos animais, demonstrando atividade central em 30 e 60 min aumentando em 164,43% ($p < 0,01$) e 122,95% ($p < 0,05$) na dose de 50 mg/kg, e 162,62% ($p < 0,01$) e 136,68% ($p < 0,05$) na dose de 100 mg/kg. O teste da formalina avaliou o efeito antinociceptivo central e periférico do EMFML. Na fase neurogênica, redução de 35,25% ($p < 0,05$) na dose de 50 mg/kg e 52,30% ($p < 0,01$) na dose de 100 mg/kg. Na dor inflamatória, foi observada uma redução de 66,39% ($p < 0,0001$) e 72,15% ($p < 0,0001$). **Conclusão:** A atividade antinociceptiva corrobora com o seu uso etnofarmacológico. Este efeito analgésico está provavelmente associado aos flavonoides identificados, todos possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antinociceptivas. Além disso, o EMFML não apresentou toxicidade.

Palavras-chave: Atividade antinociceptiva; Flavonoide; *Montrichardia linifera*; Planta medicinal; Toxicidade oral aguda.

ABSTRACT

Background: *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott is popularly known as “aninga”, “aningaçu”, “aningaíba” and “aninga-do-igapó”. The compresses and plasters from the leaves of the medicinal plant are used to treat abscesses, tumors and pain caused by stingray stings.

Aim of the study: The study aimed to investigate the antinociceptive potential of the methanolic extract of *Montrichardia linifera* leaves (MEMLL), as well as carry out chemical characterization and acute oral toxicity. **Materials and methods:** The leaves were collected during the rainy season and the methanolic extract was obtained after gradient extraction in different solvents. The MEMLL was analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) and Nuclear Magnetic Resonance (NMR). The evaluation of the acute oral toxicity test was used to observe the presence of toxic substances. Subsequently, acetic acid, hot plate and formalin tests were used to evaluate the analgesic effects. **Results:** The HPLC fingerprint analysis allowed the identification of rutin, quercetin and epicatechin. The analysis of NMR spectra identified rutin and quercetin, as well as the flavonoids luteolin and chrysoeriol. The MEMLL did not demonstrate effects considered toxic. In the acetic acid test, the MEMLL inhibited peripheral pain by 51.46% ($p < 0.05$) at a dose of 50 mg/kg and 75.08% ($p < 0.001$) at a dose of 100 mg/kg. The hot plate test evaluated the latency time of animals, demonstrating central activity at 30 and 60 min increasing by 164.43% ($p < 0.01$) and 122.95% ($p < 0.05$) at a dose of 50 mg /kg and 162.62% ($p < 0.01$) and 136.68% ($p < 0.05$) at a dose of 100 mg/kg. The formalin test evaluated the central and peripheral antinociceptive effect of the MEMLL. In the neurogenic phase, a reduction of 35.25% ($p < 0.05$) at a dose of 50 mg/kg and 52.30% ($p < 0.01$) at a dose of 100 mg/kg. In inflammatory pain, a reduction of 66.39% ($p < 0.0001$) and 72.15% ($p < 0.0001$) was observed. **Conclusion:** The antinociceptive activity supports its ethnopharmacological use. This analgesic effect is probably associated with the identified flavonoids, all of which have antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties. Furthermore, the MEMLL was non-toxic.

Keywords: Acute oral toxicity; Antinociceptive; Flavonoid; Medicinal plant; *Montrichardia linifera*.

LISTA DE FIGURA

Figura 1. Folhas do gênero Montrichardia diferenciadas pelo número de nervuras apicais secundárias. A) Montrichardia linifera. B) Montrichardia arborescens. C) Montrichardia arborescens var. aculeata. Fonte: LOPES (2017).	18
Figura 2. Fotografia da espécie Montrichardia linifera (Arruda) Schott. A) População. B) Detalhe. Fonte: AMARANTE (2011).	19
Figura 3. Sinapse ocorrendo entre o neurônio de primeira e segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, onde posteriormente o sinal percorre para o tálamo e para o córtex somatossensorial. Potencial de receptor transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), receptor de capsaicina ou pimenta malagueta. Potencial de receptor transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), isotiocianato de alila ou receptor de wasabi. Glutamato (GLU). Substância P (SP). Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). N-metil-d-aspartato (NMDA); Receptor de neuroquinina 1 (NK1). Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Complexo proteico modificador da atividade do receptor tipo calcitonina (CLR-RAMP). Fonte: PETROIANU (2023).	22
Figura 4. As áreas cerebrais e as vias neuronais envolvidas no processamento da dor e na modulação central da dor. Córtex cingulado anterior (ACC). Funículo dorsolateral (DLF). Gânglio da raiz dorsal (DRG). Locus Coeruleus (LC). Substância cinzenta periaquedutal (PAG). Córtex pré-frontal (PFC). Córtex parietal posterior (PPC). Medula ventromedial rostral (RVM). Córtex somatossensorial primário (S1). Área motora suplementar (SMA). Funículo ventrolateral (VLF) Fonte: DOGRUL et al. (2012).	24
Figura 5. Etapas do processamento de cromatografia líquida de alta eficiência do EMFML. Fonte: HUANG (2022). Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	28
Figura 6. Etapas do processamento do EMFML no RMN. Fonte: WOODLEY (2023). Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	29
Figura 7. Teste de toxicidade oral aguda. Fonte: próprio autor. Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	30
Figura 8. Teste de contorção abdominal para indução da nocicepção periférica por inflamação. Fonte: próprio autor; Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	31
Figura 9. Teste de placa quente para indução da nocicepção central por estímulo térmico. Fonte: próprio autor; Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	32
Figura 10. Teste de nocicepção induzida pela formalina 1%. Fonte: próprio autor; Ilustração representativa produzida em BioRender.com.	33

Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE. A) EMFML; B) padrão epicatequina; C) padrão rutina; D) padrão quercetina; E) padrão miricetina.; F) padrão kaempferol. Fonte: Próprio autor.	34
Figure 12. Espectro de RMN do EMFML. A) ¹H NMR. B) ¹³C NMR.	35
Figura 13. Estruturas identificados no RMN bidimensional.	36
Figura 14. Efeito antinociceptivo periférico do EMFML no teste de ácido acético. Os valores representam média + SEM. ANOVA unidirecional ordinária, seguindo o teste de comparações múltiplas de Dunnett. *p < 0,05, ***p < 0,001 denota diferença estatística em comparação ao veículo.	38
Figura 15. Efeito antinociceptivo central do EMFML no teste de placa quente. Os valores representam média + SEM. ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett. * ou + ou # significa p < 0,05, ** ou ++ ou ## significa p < 0,01, *** significa p < 0,001, **** significa p < 0,0001 denota diferença estatística em comparação com veículo.	38
Figura 16. Efeito antinociceptivo central e periférico do EMFML no teste de formalina. A) Primeira fase, avaliação neurogênica. B) Segunda fase, avaliação inflamatória. Os valores representam média + SEM. ANOVA unidirecional ordinária, seguindo o teste de comparações múltiplas de Dunnett. *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,01, ****p < 0,0001 denota diferença estatística em comparação ao veículo.	39

LISTA DE TABELA

Tabela 1. Caracterização do EMFML por RMN ¹H.	36
Tabela 2. Avaliação do ganho de peso corporal, consumo de ração e água e observação de sintomas de animais controle e tratados com MEMLL nas concentrações de 300 ou 2.000 mg/kg.	37
Tabela 3. Pesos relativos de órgãos de camundongos tratados com MEMLL nas concentrações de 300 e 2.000 mg/kg em parâmetros de toxicidade.	37

LISTA DE SIGLAS

- ACC** - Córtex cingulado anterior
- AMPA** - Receptor do glutamato tipo α -amino-3-hidróxi-5-metilsoxazol-4-propionato
- ANOVA** - Análise de Variância
- CCBS** - Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
- CEUA** - Comitê de Ética no Uso de Animais
- CGRP** - Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
- CLAE** - Cromatografia líquida de alta eficiência
- COX** - Cicloxigenase
- DLF** - Funículo dorsolateral
- DRG** - Gânglio da raiz dorsal
- EMFML** - Extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera*
- EPM** - Erro padrão da média
- IASP** - International Association for the Study of Pain
- IEC** - Instituto Evandro Chagas
- IP** - Intraperitoneal
- I.PL** - Intraplantar
- LC** - Locus coeruleus
- LIX** - Lipoxigenase
- NMF** - Núcleo magno da rafe
- OECD** - Organisation for Economic Co-operation and Development
- PAG** - Substância cinzenta periaquedutal
- PFC** - Córtex pré-frontal
- PGE2** - Prostaglandina 2
- PPC** - Córtex parietal posterior
- RMN** - Ressonância magnética nuclear
- RVM** - Medula ventromedial rostral
- SACPA** - Biotério Central da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório
- S1** - Somatossensorial primário
- SNC** - Sistema nervoso central
- SMA** - Área motora suplementar
- SNP** - Sistema nervoso periférico
- SISGEN** - Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio

SUS - Sistema Único de Saúde

SP - Substância P

SC - Subcutâneo

TRPV1 - Potencial receptor transitório vanilóide tipo 1

UEPA - Universidade do Estado do Pará

VLf – Funículo ventrolateral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Plantas medicinais e o contexto brasileiro	16
1.2 Família Araceae	17
1.3 Gênero Montrichardia Crüger	18
1.4 Espécie <i>Montrichardia linifera</i> (Arruda) Schott	19
1.5 A dor	20
1.6 Nocicepção e nociceptores	21
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1 Obtenção do extrato	27
3.2 Caracterização do extrato	27
3.2.1 Perfil cromatográfico por CLAE	27
3.2.2 Perfil espectroscópico por RMN	28
3.3 Animais experimentais	29
3.4 Avaliação da toxicidade oral aguda	29
3.5 Avaliação da atividade antinociceptiva	30
3.5.1 Teste de contorção por ácido acético 0,6%	30
3.5.2 Teste de placa quente	31
3.5.3 Teste de nocicepção induzida pela formalina 1%	32
3.6 Análise estatística	33
4 RESULTADOS	33
4.1 Caracterização do extrato	33
4.1.1 Perfil cromatográfico por CLAE	33
4.1.2 Perfil espectroscópico por RMN	34
4.2 Avaliação da toxicidade oral aguda	36
4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva	37
4.3.1 Teste de contorção por ácido acético 0,6%	37
4.3.2 Teste de placa quente	38
4.3.3 Teste de nocicepção induzida pela formalina 1%	39
5 DISCUSSÃO	39
6 CONCLUSÃO	43
REFERÊNCIAS	44

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais e o contexto brasileiro

A utilização de plantas medicinais é tão antiga quanto a própria civilização, tornou-se um meio de aliviar ou curar doenças que acometem os seres humanos (CRUZ NETO et al., 2023). É considerado uma das formas mais antigas de práticas terapêuticas, sendo os primeiros registros do uso de plantas medicinais ocorrendo desde 60.000 anos antes de Cristo, onde esteve presente em inúmeras culturas como a Egípcia, a Hindu, a Persa e a Grega (ROCHA et al., 2021). Posteriormente, outros registros de antigas populações, como a chinesa, também relatam a utilização destes para tratar diversas patologias, evidenciando a relação do homem com a natureza (FERREIRA, 2012).

Atualmente, os produtos naturais são importantes para a descoberta e desenvolvimento de fármacos. Os princípios ativos extraídos de plantas são conhecidos pelos seus resultados promissores, necessitando geralmente de pequenas alterações na sua composição química para melhorar a eficácia, aperfeiçoar métodos de administração e causar menos efeitos tóxicos (TURNATURI et al., 2024). Por esse motivo, ocorre o crescente número de pesquisas da medicina popular a fim de comprovar as propriedades farmacológicas e toxicológicas, demonstrando as atividades biológicas e as estruturas químicas com potencial de prevenir ou de tratar doenças (SÍMARO, 2021).

Neste cenário, o Brasil a partir da 8ª Conferência Nacional de Saúde em 1986, preconizava a introdução de práticas alternativas de assistência à saúde no âmbito dos serviços, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida. Posteriormente, na 10ª Conferência Nacional de Saúde em 1996, fitoterapia foi incluída nas terapias alternativas e práticas populares, e houve o incentivo a pesquisa dentro da Assistência Farmacêutica Pública pelo Ministério da Saúde. Entretanto, somente na 1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica foram aprovados projetos na área da fitoterapia, como financiamento e regulamentação de medicamentos fitoterápicos, criação de polos regionais dentro dos estados para produção de medicamentos fitoterápicos, capacitação de recursos humanos para pesquisa, produção e distribuição destes (AMARAL et al., 2006).

No decorrer do processo, a portaria nº 971 de 3 de maio de 2006 da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares propôs diretrizes que consolidaram o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema de Único de Saúde, assegurando: a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e da Relação Nacional de Fitoterápicos; promoção do uso racional de plantas medicinais e dos fitoterápicos; o cumprimento dos critérios de qualidade, eficácia, eficiência e segurança no uso; e o cumprimento das boas práticas de

manipulação, de acordo com a legislação vigente (BRASIL, 2006). E finalmente, em 22 de junho de 2006 foi aprovado a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), impulsionando a nação para outro patamar, demonstrando disposição em explorar novos fármacos de origem vegetal e aceitação da utilização de fitoterápicos, corroborando com o progresso do empreendedorismo, do desenvolvimento científico e de indústrias farmacêuticas nacionais (CRUZ NETO et al., 2023; PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Além disso, o Brasil é um país que apresenta uma grande biodiversidade e muitos recursos naturais com cerca de 20% do número total da flora no mundial distribuídos em seus biomas (VERAS et al., 2023; ROCHA et al., 2021), expondo um ambiente extremamente rico para os costumes terapêuticos tradicionais, atraindo a atenção de pesquisadores e de empresas farmacêuticas (PANTOJA et al., 2020; MENEGUELLI et al., 2020). Por essa razão, a investigação de substâncias inéditas são voltadas para os produtos naturais, visto que apresentam uma ampla diversidade química, diferentes propriedades e estruturas com potencial para o desenvolvimento de medicamentos (TURNATURI et al., 2024).

1.2 Família Araceae

Pertencente a ordem Alismatales, a família Araceae é a única com angiospermas de múltiplas variações biológicas, apresentando monocotiledôneas com estruturas morfológicas distintas (HENRIQUEZ et al., 2014, 2020). No presente momento, essa grande e antiga família contém cerca de 143 gêneros e 3.667 espécies no mundo (HAIGH et al., 2023). Encontra-se distribuída em diversos habitats como florestas tropicais, pântanos e regiões costeiras áridas e semiáridas (DÍAZ-JIMÉNEZ; GUADARRAMA-OLIVERA; CROAT, 2015).

A família Araceae é dividida em 8 subfamília: Gymnostachidoideae, Orontioideae, Lemnoideae, Pothoideae, Monsteroideae, Lasioideae, Zamioculcadoideae e Aroideae. À vista disso, o Brasil sendo um dos países com maior variedade de plantas, engloba cerca de 30 gêneros e de 700 espécies dispostos nas subfamílias Lemnoideae, Pothoideae, Monsteroideae, Lasioideae e Aroideae (CAMELO et al., 2020; FRAUSIN et al., 2015).

No cenário amazônico, as plantas dessa família são muito importantes para questões econômicas, cultivadas para demandas ornamentais, alimentícias e para a medicina popular para tratar reumatismo, malária, febre, enxaqueca, problemas hepáticos, e usada como expectorante, analgésico e anti-inflamatório (GUIMARÃES et al., 2020; FRAUSIN et al., 2015; SILVA et al., 2013). Sendo assim, dentre os gêneros da família Araceae, podemos destacar o gênero *Montrichardia* Crüger da subfamília Lasioideae.

1.3 Gênero *Montrichardia* Crüger

Em 1854 o botânico alemão Hermann Crüger, descreveu pela primeira vez o gênero *Montrichardia* Crüger (MIROUZE, 2012). Ela é composta por duas espécies, a *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott e a *Montrichardia arborescens* (L.) Schott, e uma variedade *Montrichardia arborescens* var. *aculeata* (G. Mey.) Engl. (**Figura 1**), todos presentes nas regiões tropicais, principalmente na Bacia Amazônica (LOPES; PAROLIN; PIEDADE, 2016). São macrófitas aquáticas emergentes e perenes, polinizadas principalmente por besouros e são consumidas por peixes, tartarugas, búfalos e peixes-boi (LOPES; PAROLIN; PIEDADE, 2016).

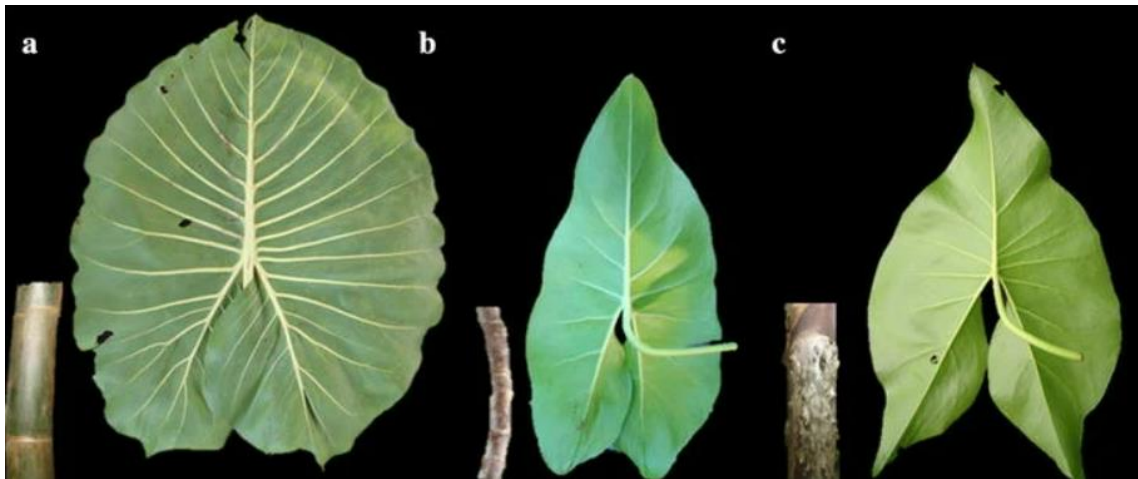


Figura 1. Folhas do gênero *Montrichardia* diferenciadas pelo número de nervuras apicais secundárias. A) *Montrichardia linifera*. B) *Montrichardia arborescens*. C) *Montrichardia arborescens* var. *aculeata*. Fonte: LOPES (2017).

Avistadas em ambientes ricos em nutrientes, como rios de águas brancas (várzea), mas também em ambientes pobres em nutrientes, como os rios de águas pretas (igapó), e ambientes salobras no estuário do Rio Amazonas. As plantas do gênero *Montrichardia* Crüger apresentam reprodução do tipo sexuada e assexuada por propagação vegetativa, formando muitas vezes uma monocamada ao longo de várzeas e de igapós (PANTOJA, 2011)

Entre as espécies é observado diferentes números de nervuras apicais secundárias, a *Montrichardia linifera* apresenta maior quantidade em relação a *Montrichardia arborescens* e *Montrichardia arborescens* var. *aculeata*, estes dois últimos podem ser diferenciados pela presença de espinhos e da densidade do caule (LOPES et al., 2017; LOPES; PAROLIN; PIEDADE, 2016).

1.4 Espécie *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott

Diante do exposto, podemos evidenciar a espécie *Montrichardia linifera* (**Figura 2**), pioneira em colonizar os solos as margens de rios, formando densas populações e resistindo ao movimento das águas, e popularmente conhecida como “aninga”, “aningaçu”, “aningaíba” e “aninga-do-igapó” (AMARANTE et al., 2011; COSTA et al., 2009). Planta nativa e não endêmica no Brasil, esta espécie encontra-se distribuída majoritariamente nos rios da Amazônia e nos estados: Amapá, Amazonas, Pará, Roraima, Bahia, Ceará, Maranhão, Piauí, Rio Grande no Norte, Sergipe, Espírito Santo e Rio de Janeiro (WFO, 2024).

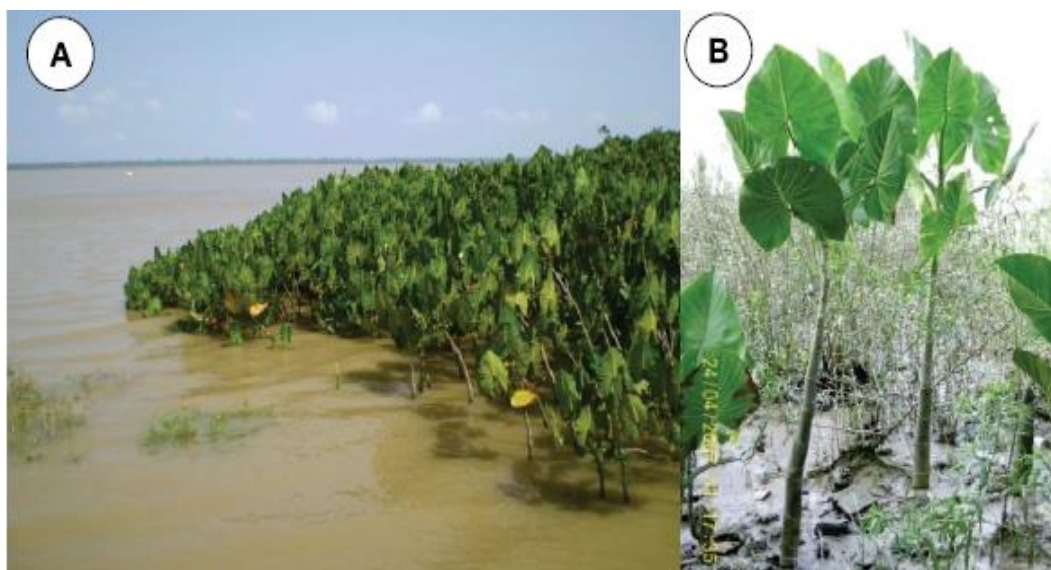


Figura 2. Fotografia da espécie *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott. A) População. B) Detalhe. Fonte: AMARANTE (2011).

Esta espécie possui alto valor econômico, pois seu caule é muito utilizado para construção de jangadas para transportar madeira pelos rios (BARBOSA; MONTAG, 2017). Sua inflorescência é uma espádice simples de coloração branca amarelada, a qual compreende uma região feminina (flores pistiladas) e uma masculina (região de flores estaminadas). A sua fruta é infrutescente de cor verde amarelado, ou seja, formada por um conjunto compacto de frutos aderidos um ao outro, de forma que o conjunto se assemelha a um fruto parecido como um abacaxi (BATISTA et al., 2023).

Sua seiva é tradicionalmente utilizada na etnofarmacologia brasileira como cicatrizante, anti-reumático, antidiurético e expectorante. Porém, seu uso excessivo pode ser considerado tóxico devido à capacidade de causar queimaduras, erupções cutâneas e manchas e, em caso de contato com os olhos, cegueira (LIMA et al., 2021). A raiz da planta é usada como antifúngico e anestésico contra ferroadas de arraia (BATISTA et al., 2019). As

compressas e emplastos das folhas também são usados no tratamento de abscessos, tumores (AMARANTE et al., 2011b) e contra ferroada de arraia . Entretanto, não há muitas pesquisas científicas sobre os efeitos biológicos *in vivo* da planta para compreender de fato o seu potencial farmacológico.

Com base no seu uso tradicional, o presente estudo buscou investigar os efeitos antinociceptivos da planta medicinal *Montrichardia linifera*.

1.5 A dor

Em muitas doenças, a dor serve como um sistema de alerta entre estímulos nocivos, um mecanismo de defesa quando algo no corpo não está funcionando adequadamente (VARGAS-RUIZ et al., 2023), sendo o principal fator para que as pessoas procurem por tratamentos médicos (COHEN; VASE; HOOTEN, 2021). É uma competência individual e de caráter subjetivo compreendida pelas experiências vividas, apresentando interações altamente complexas e dinâmicas na rede neural, entre múltiplos fatores biológicos, psicológicos e sociais (FILLINGIM, 2017). Desse modo, o conceito de dor atualmente é “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ou semelhante, à associada a um dano tecidual real ou potencial”, de acordo com a Associação Internacional do Estudo da Dor (do inglês *International Association for the Study of Pain - IASP*) (RAJA et al., 2020)

Na literatura científica existem diversas definições de dor, entretanto, nenhum termo abrange todas as formas em que haja a manifestação dolorosa. Portanto, a dor pode ser conceituada de acordo com a sua duração, origem fisiológica e localização.

Tendo em vista a sua duração, a dor pode ser classificada de duas formas temporais: aguda ou crônica. A dor aguda pode ocorrer de forma repentina, retratada como dor abrupta ou intensa, geralmente em resposta a trauma tecidual e processos inflamatórios relacionados. A dor crônica é um problema que afeta cerca de 30% da população mundial, ocorre de forma prolongada devido uma patologia não diagnosticada ou não tratada corretamente, persistindo por mais de três meses (COHEN et al., 2021; WANG & MULLALLY, 2020).

Em sequência, a origem da dor pode ser descrita como nociceptiva, neurogênica, neuropática e inflamatória. A dor nociceptiva é um termo utilizado para descrever a dor que ocorre no sistema nervoso somatossensorial funcionando normalmente, surge de um dano real ou iminente a tecido devida à ativação de neurônios sensoriais primários (CATLEY; MOSELEY; JONES, 2019). Em contrapartida, a dor neurogênica (termo agudo) e a dor neuropática (termo crônico) são utilizados para descrever a dor que ocorre no sistema nervoso funcionando de forma anormal, que surge de uma lesão ou doença que causam alterações no

sistema nervoso somatossensorial a nível central ou periférico (CHAUVET, 2020; GIERTHMÜHLEN; BARON, 2016). Por último, temos a dor inflamatória, que surge devido a liberação de mediadores inflamatórios por células tumorais ou pelo tecido lesionado, ocasionando uma sensibilização química dos nociceptores aos estímulos dolorosos (MULEY; KRUSTEV; MCDOUGALL, 2016).

Quanto a sua localização, a dor pode ser compreendida como somática ou visceral. A dor somática surge do estímulo nocivos (mecânicos, térmicos e químicos) em tecido cutâneo ou músculo-esquelético, onde geralmente as dores são bem definidas e bem localizadas (ÖHLMANN et al., 2023; VAN OUDENHOVE et al., 2020). A dor visceral surge de um desconforto nos órgãos internos da cavidade torácica, abdômen ou pelve, por exemplo, intestino, pâncreas, coração, rim, bexiga urinária e órgãos genitais. Frequentemente está associada a uma sensação difusa, complexa, mal definida e relacionada a reações inflamatórias, característica de patologias como doença inflamatória intestinal, pancreatite e síndrome do intestino irritável (EIDELMAN; CARR, 2006; JOHNSON; GREENWOOD-VAN MEERVELD, 2016; TAO; TRAUB; CAO, 2019).

1.6 Nociceção e nociceptores

A nociceção é um mecanismo protetor do organismo, codificando processos neurais de estímulos nocivos que chegam ao sistema nervoso central (SNC) pela ativação de neurônios sensoriais especializados, chamados de nociceptores, presentes no sistema nervoso periférico (SNP) em quase todo o organismo (ARMSTRONG; HERR, 2024). Estes receptores nociceptivos são divididos em três classes principais: térmicos, mecânicos e polimodais.

Os nociceptores térmicos e mecânicos estão presentes nas fibras aferentes primárias A δ , possuem mielina e são relacionadas a dor aguda, denominadas de “primeira dor” uma vez que manifestam rápida resposta aos estímulos dolorosos de forma pontual e intensa. Os nociceptores polimodais estão presentes nas fibras do tipo C, podem ser ativadas por estímulos térmicos, mecânicos e químicos, entretanto, são amielínicos e possuem diâmetro pequeno, conduzindo o impulso de forma lenta e gradual, sendo descrito como de “segunda dor” ou de “dor tardia” devido uma patologia não diagnosticada ou não tratada corretamente (FENTON; SHIH; ZOLTON, 2015; JIN et al., 2018).

A sinalização dos estímulos nocivos são transmitidos das terminações nervosas de nociceptores e encaminhados para seus corpos celulares nos gânglios da raiz dorsal (DRG), presentes de forma organizada em lâminas, nas raízes dorsais da medula espinhal. As fibras do tipo A δ e C são neurônios específicos da dor, localizadas na lâmina I (ou lâmina marginal),

sendo assim, respondendo de forma seletiva aos estímulos dolorosos e projetando-se para o mesencéfalo e para o tálamo (LIGHT, 1988). Estas fibras também são encontradas na lâmina II (ou substância gelatinosa) junto a interneurônios locais, apresentando respostas nociceptivas. O estímulo nociceptivo ainda pode ocorrer na lâmina V, onde tem-se as fibras A δ e projetam-se para o tronco cerebral e para o tálamo (YEN; LU, 2013).

Para que o impulso nociceptivo aconteça, ocorre a ativação do potencial receptor transitório na membrana do nociceptor, a abertura dos canais iônicos resulta na despolarização e na propagação do potencial de ação (ARAUJO et al., 2020). A exemplo disso, conforme a **Figura 3**, quando ocorre o estímulo nocivo, com limiar de ativação em torno de 43°C, temperatura que provoca a dor térmica, é expresso seletivamente o potencial de receptor transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), mais conhecido como receptor de capsaicina (PETROIANU; ALOUM; ADEM, 2023). Em temperaturas mais elevadas, em torno de 52°C ou mais, ocorre a ativação do potencial de receptor transitório vanilóide tipo 2 (TRPV2), aumentando a sensação de dor térmica, causando a hiperalgesia (BARBOSA et al., 2023). Além disso, tem-se outro canal relacionado a dor, o potencial de receptor transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), conhecido como receptor de wasabi (isotiocianato de alila), que atua em conjunto com o TRPV1 (SODHI et al., 2021).

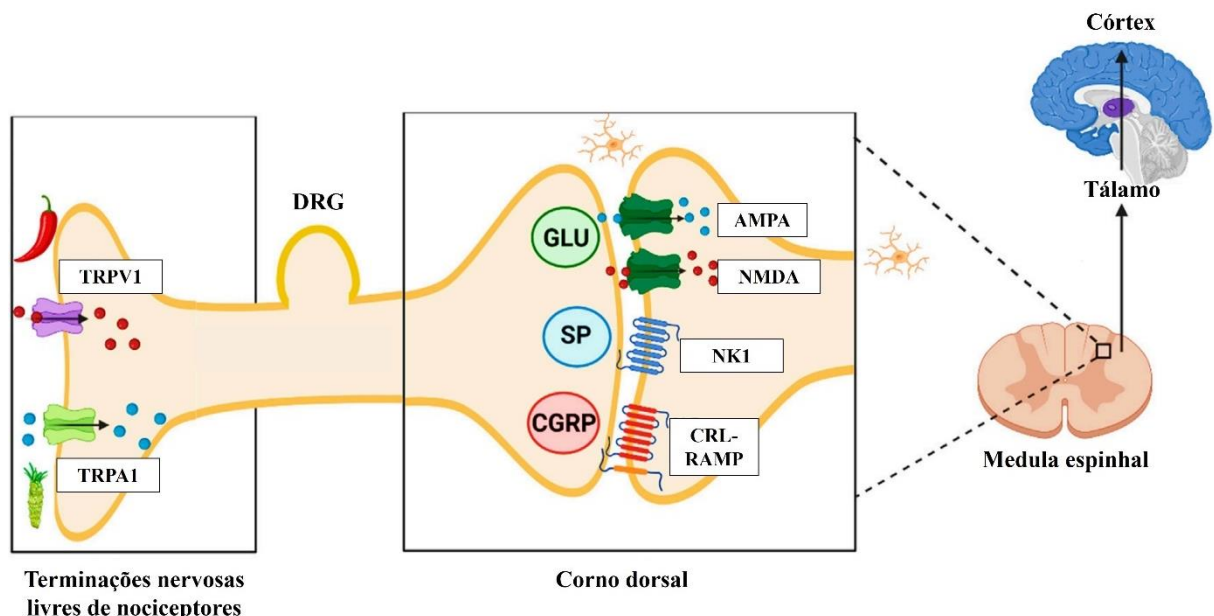


Figura 3. Sinapse ocorrendo entre o neurônio de primeira e segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, onde posteriormente o sinal percorre para o tálamo e para o córtex somatossensorial. Potencial de receptor transitório vanilóide tipo 1 (TRPV1), receptor de capsaicina ou pimenta malagueta. Potencial de receptor transitório anquirina tipo 1 (TRPA1), isotiocianato de alila ou receptor de wasabi. Glutamato (GLU). Substância P (SP). Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico (AMPA). N-metil-d-aspartato

(NMDA); Receptor de neuroquinina 1 (NK1). Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Complexo proteico modificador da atividade do receptor tipo calcitonina (CLR-RAMP). Fonte: PETROIANU (2023).

A abertura destes canais de permite o influxo de cálcio e sódio, resultando na propagação da despolarização até o corno dorsal, liberando as vesículas pré-sinápticas como o glutamato (GLU) e substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (GLARE; AUBREY; MYLES, 2019). O GLU é um neurotransmissor excitatório importante para a sinalização da dor, exercendo seu efeito nos receptores dos neurônios pós-sinápticos. O receptor pós-sináptico de glutamato α -amino-3-hidróxi-5-metiloxazol-4-propionato (AMPA) propaga rapidamente a despolarização, ativando o receptor do glutamato tipo N-metil-d-aspartato (NMDA). A SP ativa os receptores antagonistas de neurocinina-1 (NK1), provocando potenciais pós-sinápticos excitatórios lentos que prolongam a despolarização provocada pelo glutamato, causando dor persistente e a CGRP provoca a vasodilatação local (MCCARBERG; PEPPIN, 2019; PETROIANU; ALOUM; ADEM, 2023).

Decorrendo a sinapse química no corno dorsal, as informações são conduzidas pela medula espinhal, onde apresenta cinco vias ascendentes principais: os tratos espino-talâmico, espino-parabraquial, espino-mesencefálico, espino-rreticular e espino-hipotalâmico (DAVIDSON; MOSER; GIESLER, 2014).

Dentre estes, acredita-se que o trato espino-talâmico seja via mais proeminente, visto que existem resultados promissores para alívio da dor em cordotomias anterolaterais, procedimento que geralmente é utilizado apenas para dor intratável em pacientes com câncer terminal (AL-CHALABI; REDDY; GUPTA, 2023). Esta via apresenta os axônios de neurônios nociceptivos específicos presente nas lâminas I e V do corno dorsal, onde cruzam a linha média da medula espinhal e ascendem na substância branca anterolateral e chegam nos núcleos do talâmicos (WEBB; STEEDS, 2022). Posteriormente, são retransmitidas para a “matriz da dor” (**Figura 4**), onde inclui-se o córtex somatossensorial primário e secundário, o córtex insular, o córtex cingulado anterior (ACC), os córtices parietais pré-frontal e posterior, bem como o tálamo, amígdala e cerebelo (DOGRUL et al., 2012).

Após o processamento dos estímulos nocivos, as vias descendentes surgem de uma variedade de áreas supraespinhais, incluindo ACC, amígdala e hipotálamo, enviando informações para a substância cinzenta periaquedutal (PAG) e posteriormente projetam-se para o locus coeruleus (LC) e para o núcleo magno da rafe (NMF), conduzindo o fluxo final de informações nociceptivas para o corno dorsal (LOPEZ-ALVAREZ et al., 2018). Dessa forma, ativando respostas defensivas, cuja saída antinociceptiva desencadeia inibição

descendente de forma modulatória com a liberação de noradrenalina no LC pelas fibras do funículo ventrolateral (VLF) e de serotonina no NMF pelas fibras do funículo dorsolateral (DLF), originando respectivamente, a via noradrenérgica e a via serotoninérgica (BOURNE; MACHADO; NAGEL, 2014; LOPES et al., 2019).

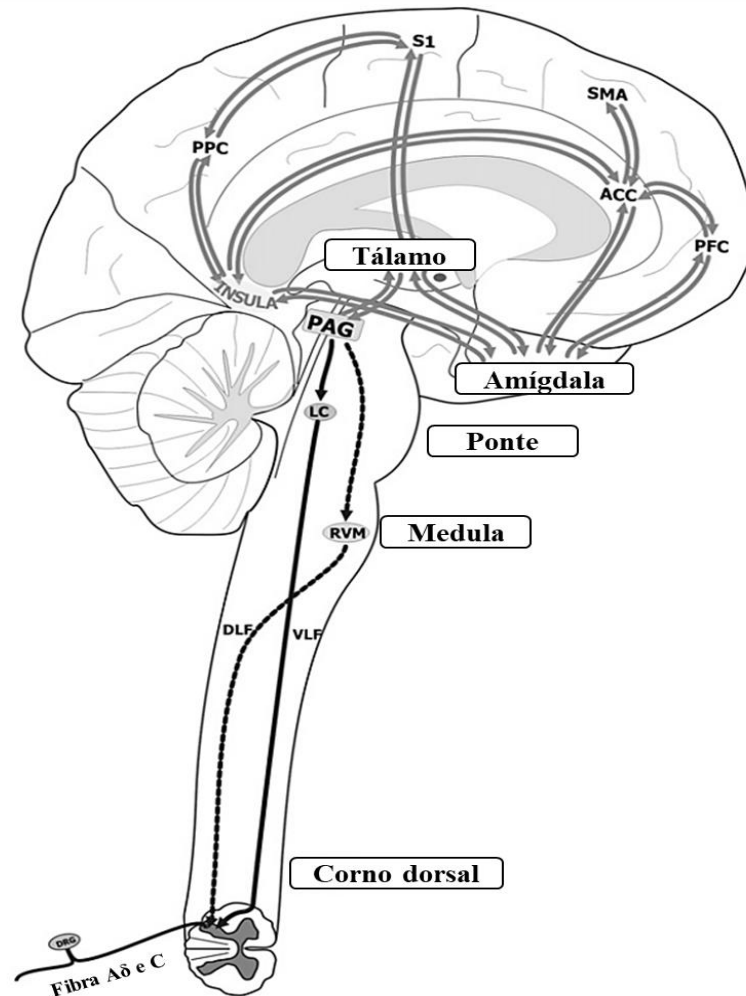


Figura 4. As áreas cerebrais e as vias neuronais envolvidas no processamento da dor e na modulação central da dor. Córtex cingulado anterior (ACC). Funículo dorsolateral (DLF). Gânglio da raiz dorsal (DRG). Locus Coeruleus (LC). Substância cinzenta periaquedual (PAG). Córtex pré-frontal (PFC). Córtex parietal posterior (PPC). Medula ventromedial rostral (RVM). Córtex somatossensorial primário (S1). Área motora suplementar (SMA). Funículo ventrolateral (VLF) Fonte: DOGRUL et al. (2012).

Outro mecanismo que exerce um papel fundamental no controle da dor são os receptores opióides, inibindo diretamente os neurônios na medula espinhal. Os principais subtipos são o delta (δ), mu (μ) e kappa (κ); expressos em diferentes partes do corpo como cérebro, medula espinhal e trato digestivo (MOSIŃSKA; ZIELIŃSKA; FICHNA, 2016; WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004). Estes são ativados por substância endógenas

(endomorfina, encefalina e dinorfina) e por pequenas moléculas semissintéticas ou sintéticas, gerando efeitos analgésicos forte (ANAND; MONTGOMERY, 2018; SHANG; FILIZOLA, 2015).

Por este motivo, o alívio de dores moderadas a intensas, de forma aguda ou crônica, são utilizados os analgésicos opióides, conhecidos atualmente como um recurso padrão-ouro (PREUSS; KALAVA; KING, 2024). No entanto, a prescrição de fármacos convencionais, como a morfina, apresentam danos colaterais negativos, resultando em náusea, vômito, prisão de ventre, depressão respiratória e dependência, necessitando de mais intervenções terapêuticas para amenizar os efeitos adversos e consequentemente mais tempo de recuperação do paciente (WOLF et al., 2024).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Caracterizar quimicamente, avaliar a toxicidade oral aguda e a atividade antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente as substâncias do extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott;
- Investigar os efeitos da toxicidade oral aguda do extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott;
- Investigar os efeitos da atividade antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção do extrato

O EMFML foi doado gentilmente pelo Laboratório de Análises Químicas do Museu Emílio Goeldi, coordenado pela professora Dr^a. Cristine Bastos do Amarante. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário João Murça Pires do Museu Emílio Goeldi sob o registro MG 216695 e cadastrada no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético (SISGEN) sob o cadastro A91B68B.

3.2 Caracterização do extrato

O EMFML foi caracterizado a partir da adaptação dos métodos descritos por Pinheiro et al. (2022) e Singh (2018), sendo utilizadas as técnicas analíticas de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrometria de ressonância magnética nuclear (RMN) no Laboratório Central de Extração da Universidade Federal do Pará, coordenado pelo professor Dr. Wandson Braamcamp de Souza Pinheiro.

3.2.1 Perfil cromatográfico por CLAE

Ao extrato investigado foi realizado um *clean-up* para a retirada de pigmentos hidrofóbicos, como clorofilas. Para tal finalidade foi realizada a remoção destes interferentes por extração de fase sólida (EFS). Inicialmente um cartucho Strata C18, 1g.6mL-1, foi limpo e ativado com acetonitrila e água respectivamente. Seguido da injeção de 180 mg de extrato solubilizado em água / acetonitrila (30:70) e extração com dois volumes na mesma proporção. Após a obtenção das soluções extratoras, foram secas em estufa com circulação de ar.

A análise cromatográfica por CLAE do EMFML foi realizada em cromatógrafo líquido modelo Prominence LC-20AT (Shimadzu, Tokyo, Japão) com detector de arranjo de diodo (DAD) e coluna Gemini C18 (250 mm x 4,6 mm, 5µm) (PHENOMENEX – Torrance, USA) (**Figura 5**). Para o tratamento de dados utilizou-se o software LC/solution 1.20. Foram aplicados 20 µL / injeção do EMFML tratado padronizado a 1000 ppm e eluídos em modo gradiente amplo de acetonitrila / água, com modificador orgânico variando linearmente de 5 a 100%, em 60 minutos e fluxo de 1 mL/min. A amostra foi monitorada a partir da absorvância dos compostos sob radiação ultravioleta, de 200 a 400 nm. Para a obtenção do *fingerprinting* foram comparados os tempos de retenção (t_r) dos padrões de flavonoides epicatequina, rutina, quercetina, miricetina e kaempferol com os observados para o EMFML.

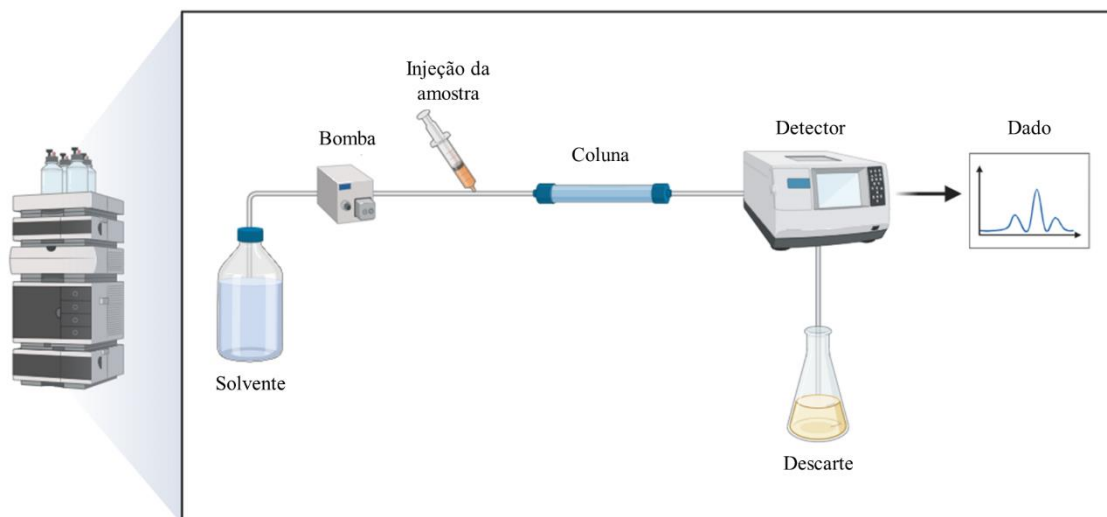


Figura 5. Etapas do processamento de cromatografia líquida de alta eficiência do EMFML. Fonte: HUANG (2022). Ilustração representativa produzida em BioRender.com.

3.2.2 Perfil espectroscópico por RMN

Os espectros de RMN de ^1H e ^{13}C , assim como os mapas de correlações *Homonuclear Correlation Spectroscopy* (HOMO-COSY), *Heteronuclear Single Quantum Coherence* (HSQC) e *Heteronuclear Multiple Bond Coherence* (HMBC), foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelo Ascend™ (Rheinstetten, Germany), operando a 400 e 100 MHz (**Figura 6**). A amostra foi preparada utilizando 50 mg de EMFML e diluído em 600 μL de dimetilsulfóxido deuterado (DMSO- d_6).

Para o controle e tratamento de dados, utilizou-se o software TopSpin 3.6.0, e os *free induction decay* (FIDs) foram submetidos a transformada de Fourier, com $\text{LB} = 0.3 \text{ Hz}$. Os espectros foram tratados manualmente, corrigidos na linha de base e calibrados, tendo como referência interna o sinal residual do solvente DMSO em 2.49 (^1H) e 39.5 ppm (^{13}C). No processamento dos FIDs foram realizados ainda, a investigação da abundância de grupos funcionais presentes nas classes fitoquímicas de interesse, agrupando-os em regiões específicas ($\delta = 0.5 - 1.5 / 1.5 - 3.0 / 3.0 - 4.5 / 4.5 - 6.0 / 6.0 - 9.0 / 9.0 - 10.0$), e a normalização das integrais das respectivas regiões.

Para o assinalamento dos picos, utilizou-se os dados de deslocamento químico (δ) e constante de acoplamento (J) dos espectros unidimensionais (1D) ^1H e ^{13}C , além dos mapas de correlação bidimensionais (2D) $^1\text{H} \ ^1\text{H}$ (HOMO-COSY), $^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ (HSQC) e $^1\text{H} \ ^{13}\text{C}$ (HMBC). Os dados experimentais foram comparados com os respectivos sinais da literatura para estruturas de flavonoides.

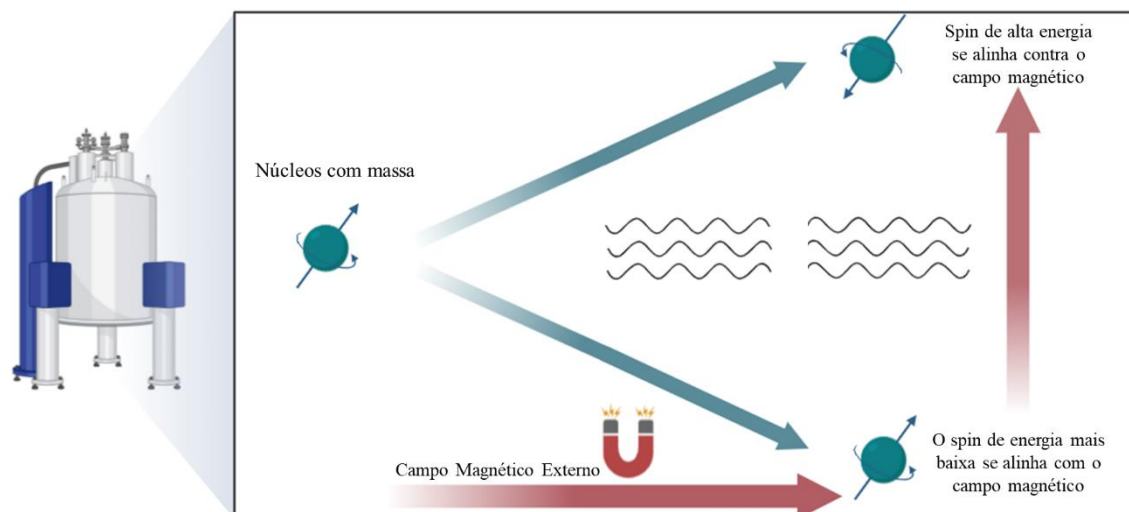


Figura 6. Etapas do processamento do EMFML no RMN. Fonte: WOODLEY (2023). Ilustração representativa produzida em BioRender.com.

3.3 Animais experimentais

Neste estudo, foram utilizados 88 camundongos (*Mus musculus*) machos da linhagem suíço com idade de aproximada de 8 semanas. Os animais foram obtidos do Biotério Central da Seção de Criação e Produção de Animais de Laboratório do Instituto Evandro Chagas (SACPA/IEC) e posteriormente foram alocados no Biotério do Central Luiz Carlos de Lima Silveira do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade do Estado do Pará (CCBS/UEPA). Foram mantidos em salas com gaiolas adequadas com maravalha estéril, ciclo 12h claro/escuro, temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e acesso a água filtrada e ração *ad libitum*.

O projeto foi submetido previamente ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UEPA e aprovado sob o protocolo N°09/17.

3.4 Avaliação da toxicidade oral aguda

Para determinar a toxicidade oral aguda do EMFML foi utilizado o método de classe tóxica aguda da diretriz n°423 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês *Organisation for Economic Co-operation and Development*) (OECD, 2002). Foram utilizados 18 animais divididos em três grupos: controle, EMFML 300 e 2.000 mg/kg.

Os camundongos foram individualizados e colocados em restrição alimentar por uma hora e água *ad libitum*, conforme a **Figura 7**. Em seguida, com o auxílio de uma cânula orogástrica, foi administrado em dose única por via oral o veículo (Tween 80 a 1% diluído em

solução salina) para o grupo controle e para os grupos EMFML 300 e 2.000 mg/kg, o extrato foi diluído nas respectivas doses em Tween 80 a 1%. Posteriormente, os animais foram observados nas primeiras 4 horas. Segundo o teste descrito por Malone e Robichaud (1962), pode ocorrer alteração nos parâmetros comportamentais como falta de apetite, diarreia, respiração acelerada, secreção nasal, ataxia, agressividade, irritação nos olhos, piloereção, convulsão, disfunção motora, sonolência e salivação.

Após este período, os animais foram observados a cada 24 horas por 14 dias e registrados os pesos dos camundongos, a quantidade de ração e água consumida (dia 1, 4, 8, 11 e 14), e no último dia foi realizado a eutanásia com associação de dose letal de cloridrato de xilazina (30 mg/kg) e cloridrato de cetamina (300 mg/kg) para análise macroscópica e medida morfométrica dos órgãos (fígado, rim e baço).

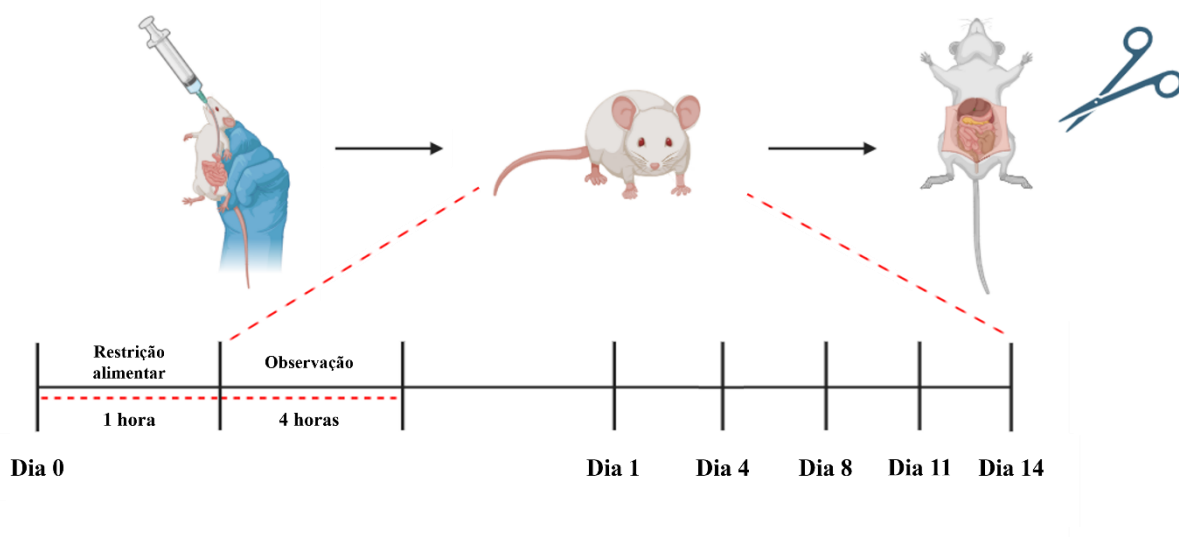


Figura 7. Teste de toxicidade oral aguda. Fonte: próprio autor. Ilustração representativa produzida em BioRender.com.

3.5 Avaliação da atividade antinociceptiva

3.5.1 Teste de contorção por ácido acético 0,6%

Foi utilizado o método de indução de nocicepção periférica por ácido acético a 0,6% (0,1 mL para cada 10g animal) via intraperitoneal proposto por Koster (1959). Para isso, foram utilizados 30 camundongos divididos em seis grupos: controle, EMFML (10, 25, 50 e 100 mg/kg) e indometacina.

Uma hora antes do experimento os animais receberam por via oral, veículo (Tween 80 a 1% diluído em solução salina) para o grupo controle, para os grupos tratamentos os EMFML

(10, 25, 50 e 100 mg/kg) foram diluídos em Tween 80 a 1%, e a droga padrão indometacina 5 mg/kg via intraperitoneal (i.p.). Com a administração do ácido acético 0,6%, os camundongos apresentaram reações de contração do abdômen, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Foi quantificada o número total de reações nos primeiros 30 minutos (**Figura 8**).

Os melhores resultados do extrato foram escolhidos para os demais teste de nocicepção.

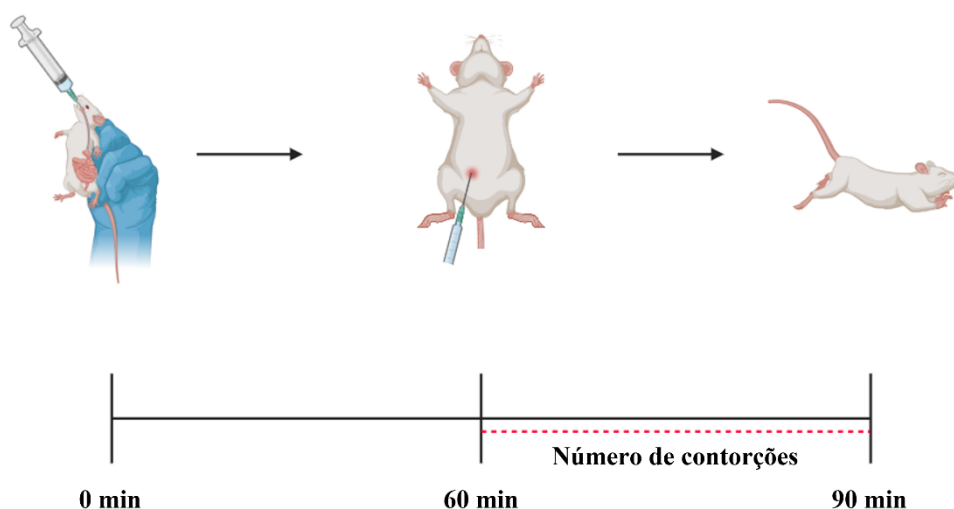


Figura 8. Teste de contorção abdominal para indução da nocicepção periférica por inflamação. Fonte: próprio autor; Ilustração representativa produzida em BioRender.com.

3.5.2 Teste de placa quente

Para avaliar a atividade antinociceptiva central, os camundongos foram submetidos ao método proposto por Macdonald em 1946, colocados sobre uma placa de alumínio aquecida a $55 \pm 0.5^\circ\text{C}$, apresentando reações estereotípicas como saltar, bater ou lamber as patas. Foram utilizados 20 animais divididos em quatro grupos: controle, EMFML 50 e 100 mg/kg, e morfina.

Conforme a **Figura 9**, os camundongos receberam por gavagem, veículo (Tween 80 a 1% diluído em solução salina) para o grupo controle e para os grupos tratamentos, os EMFML 50 e 100 mg/kg foram diluídos em Tween 80 a 1%, e morfina 10 mg/kg por via subcutânea (s.c.). O teste teve duração de duas horas para avaliar a atividade antinociceptiva central, divididos em 5 tempos de análise da latência sob a placa de alumínio quente, mantendo um intervalo de trinta minutos, respeitado o tempo máximo de permanência dos animais de 40 segundos para cada avaliação.

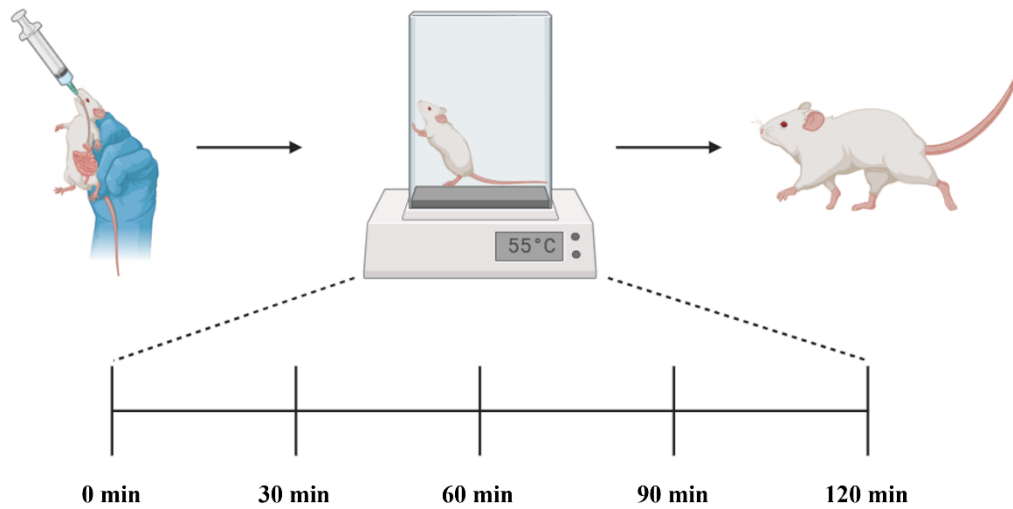


Figura 9. Teste de placa quente para indução da nociceção central por estímulo térmico. Fonte: próprio autor; Ilustração representativa produzida em BioRender.com.

3.5.3 Teste de nociceção induzida pela formalina 1%

Para corroborar com os resultados da nociceção central e periférica, foi utilizado o teste de nociceção bifásica induzida pela injeção intraplantar de formalina 1%. A primeira fase (0-5 minutos) corresponde a dor neurogênica e a segunda fase (15-30 minutos) corresponde a dor inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Foram usados 20 animais divididos em quatro grupos: controle, EMFML 50 e 100 mg/kg, e morfina. Uma hora antes do experimento os camundongos receberam por via oral, veículo (Tween 80 a 1% diluído em solução salina) para o grupo controle, para os grupos tratamentos, os EMFML 50 e 100 mg/kg foram diluídos em Tween 80 a 1%, e morfina 4 mg/kg por via s.c. 30 minutos antes. Após este período, foi administrado por via intraplantar (i.pl.) 20 μ L de solução de formalina a 1% na pata traseira direita, posteriormente, o animal expressou reações como a lambertura de pata (**Figura 10**) e foi cronometrado o tempo de lambida nas duas fases nociceptivas.

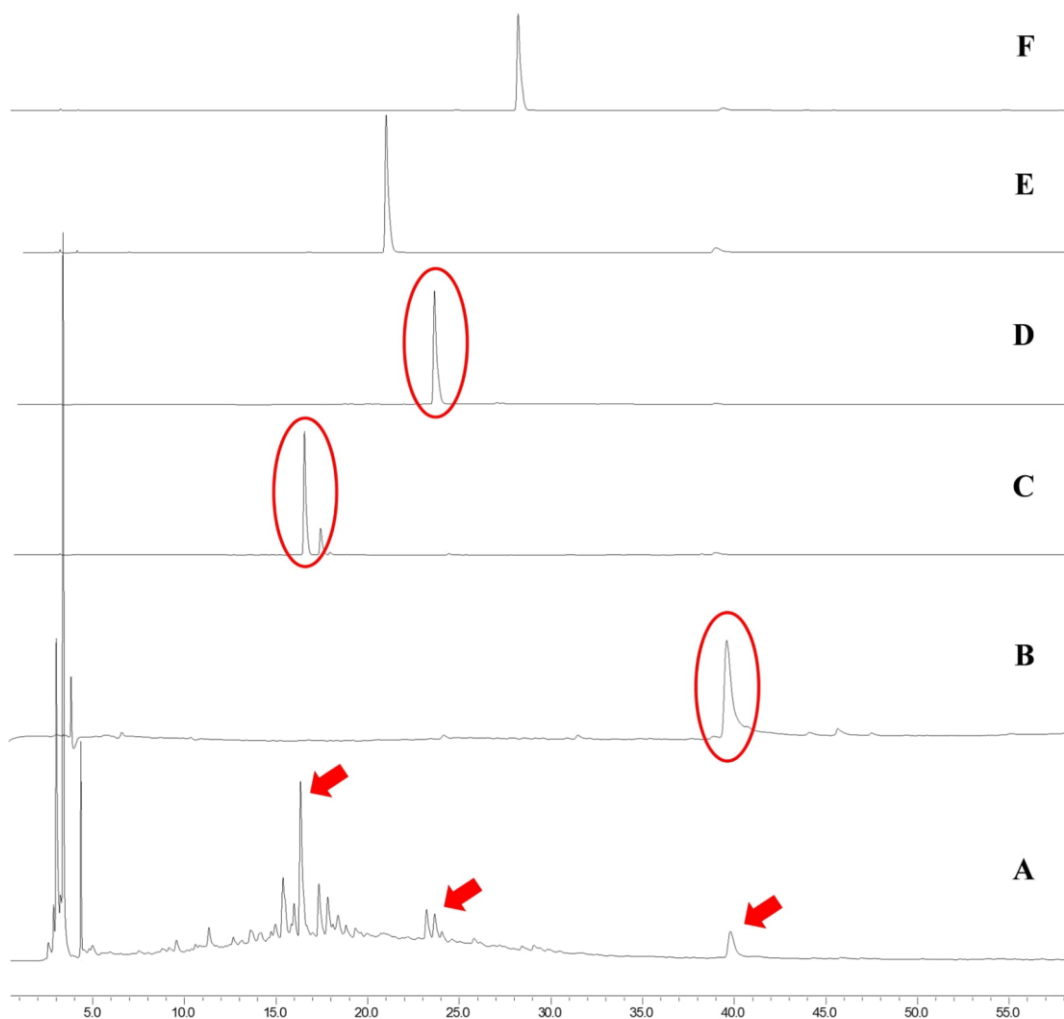


Figura 11. Perfil cromatográfico por CLAE. A) EMFML; B) padrão epicatequina; C) padrão rutina; D) padrão quercetina; E) padrão miricetina.; F) padrão kaempferol. Fonte: Próprio autor.

4.1.2 Perfil espectroscópico por RMN

No espectro de RMN ^1H (**Figura 12.a**) e ^{13}C (**Figura 12.b**) do EMFML foram obtidos os dados unidimensionais (**Tabela 1**) e bidimensionais (**Figura 13**) para avaliar a composição química por meio de frações subestruturais (grupos funcionais) e sua abundância de acordo com a normalização das integrais por regiões espectral.

Observa-se que na δ_{H} 0.5 a 1.5, compreende os sinais de hidrogênios de grupos metílicos (-CH₃), metilênicos (-CH₂) e metínicos (-CH), típicos de grupos alquila, com aproximadamente 15.79%. A região do espectro de δ_{H} 1.5 a 3.0, típica de hidrogênios de -CH₃ / -CH₂ / -CH ligados a carbono insaturado (CH₃-C=C / CH₂-C=C / CH-C=C), a carbonila de cetona ou aldeído (CH₃-COR / CH₂-COR / CH-COR), a carboxila (CH₃-COOR / CH₂-COOR / CH-COOR), a átomos de nitrogênio (CH₃-N / CH₂-N / CH-N) ou ligados

diretamente a anel aromático (CH₃-Ph / CH₂-Ph / CH-Ph), uma área percentual de 10.63%. Para a região de δ_H 3.0 a 4.5 correspondente aos sinais de hidrogênios ligados a carbonos oxidados (CH₂-OH / CH-OH) ou a grupos alcóxi, fenóxi e acilatos (PhO-CH₃ / PhO-CH₂ / RCOO-CH₃ / RCOO-CH₂ / RCOO-CH), apresentou a maior área percentual do extrato estudado, 62.37%, indicando assim, uma alta composição de açúcares. Além disso, na região de hidrogênios de grupos olefínicos δ_H 4.5 a 6.0 (CH₂=CH-R / R-CH=CH-R) apresentou 6.08% da integração do espectro. Uma outra região de destaque, foi a de hidrogênios ligados a carbonos aromáticos (Ph-H) ou a carbonos olefínicos vicinais a anel aromático (Ph-CH=CH-R), a qual mostrou maior teor de hidrogênios aromáticos para o extrato 5.13%.

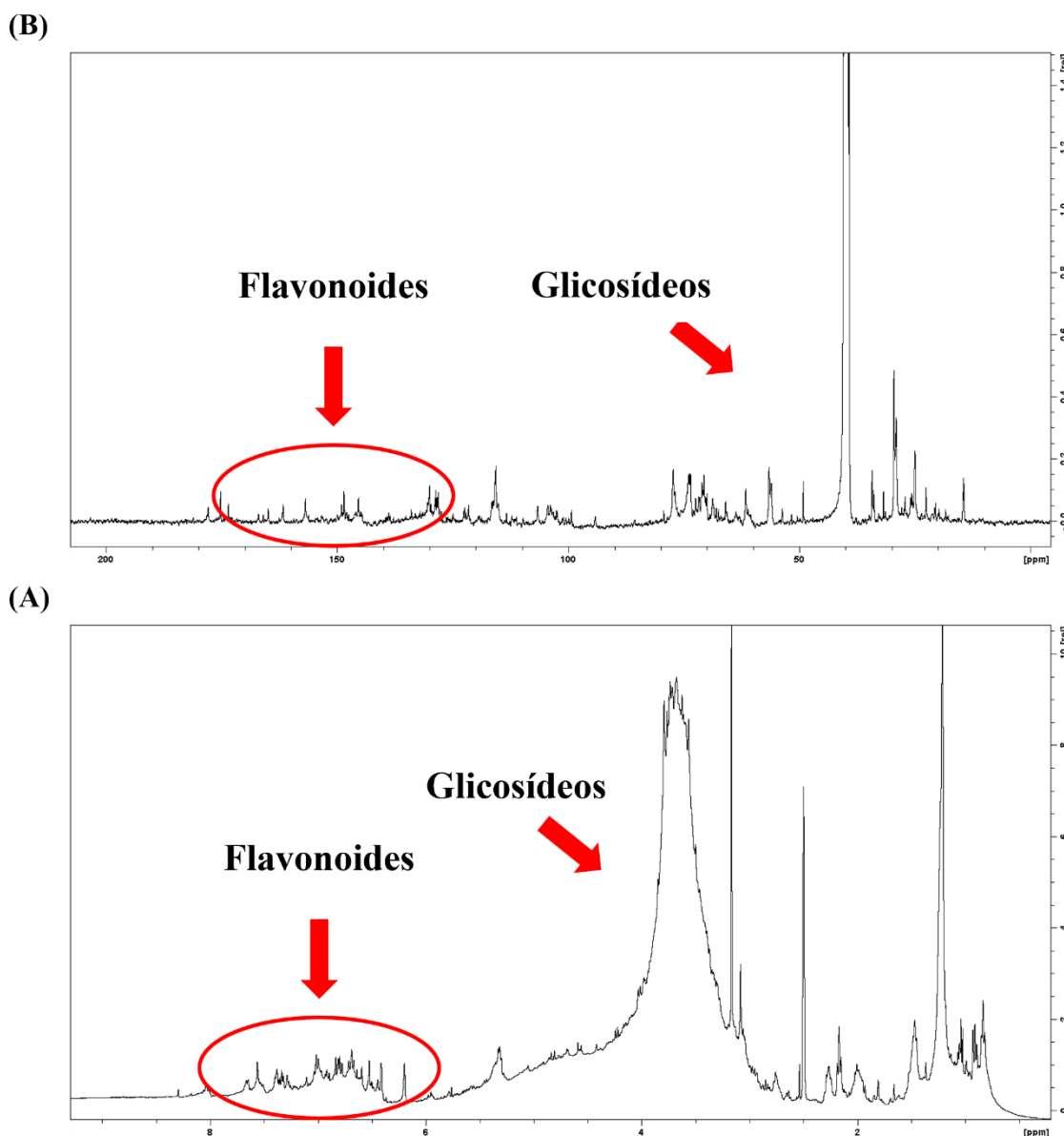
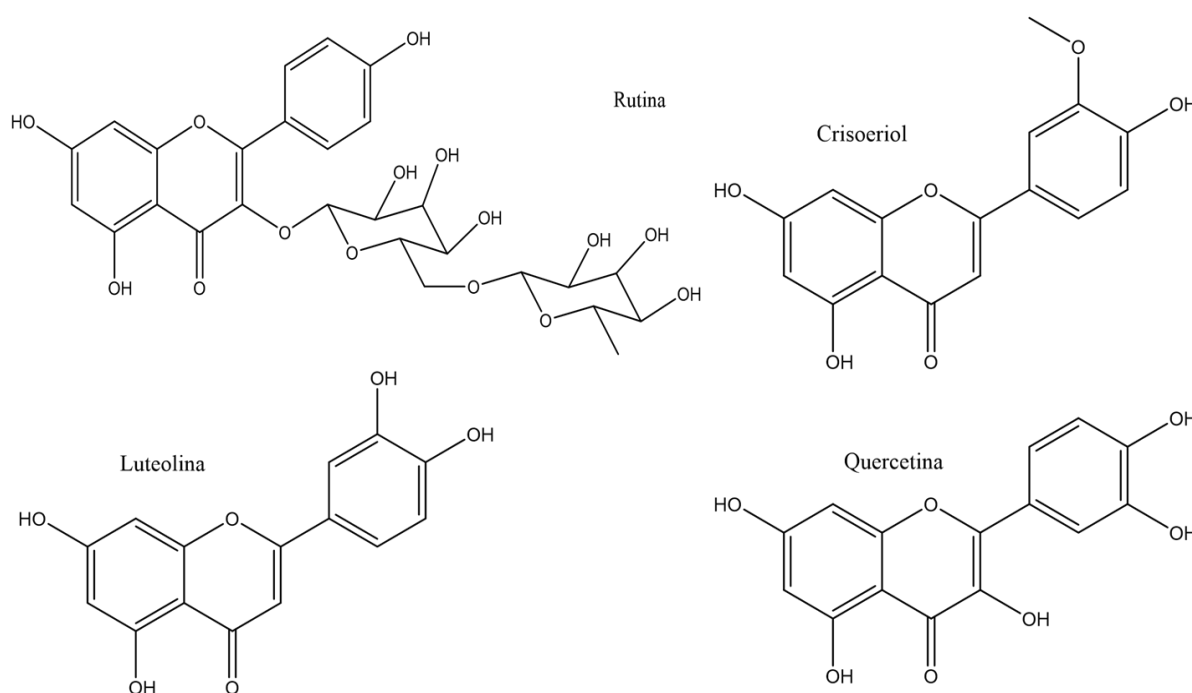


Figure 12. Espectro de RMN do EMFML. A) ¹H NMR. B) ¹³C NMR.

Tabela 1. Caracterização do EMFML por RMN ¹H.

Mudança química (ppm)*	Estrutura	Área (%)
0.5 – 1.5	C- <u>CH</u> _n	15.79
1.5 – 3.0	CH _n -C=C; CH _n -COR; CH _n -COOR; CH _n -N; CH _n -Ph	10.63
3.0 – 4.5	CH _n -OH; PhO-CH _n ; RCOO-CH _n ; CH ₂ -NHCOR	62.37
4.5 – 6.0	CH _n =CH	6.08
6.0 – 9.0	Ph- <u>H</u> ; Ph- <u>CH</u> =CH-R	5.13

n = número de hidrogênios, em que $1 \leq n \leq 3$. *(PINHEIRO et al., 2022).

**Figura 13. Estruturas identificados no RMN bidimensional.**

4.2 Avaliação da toxicidade oral aguda

Conforme é observado na **Tabela 2**, após a administração da dose única de 300 e 2.000 mg/kg de EMFML não foram constatados alterações comportamentais durante o experimento, assim como, não houve diferenças no ganho de peso dos animais (g), no consumo de ração (g) e de água (mL). Além disso, na **Tabela 3** é observado que não houve variação significativamente no peso relativo dos órgãos, e os camundongos permaneceram vivos no decorrer do teste.

Tabela 2. Avaliação do ganho de peso corporal, consumo de ração e água e observação de sintomas de animais controle e tratados com MEMLL nas concentrações de 300 ou 2.000 mg/kg.

Grupos	Ganho de massa (g)	Consumo de comida (g)	Consumo de água (mL)	Sintomas observados
Veículo	2.85 ± 0,11	80.12 ± 0,98	106.7 ± 3.58	Nenhum
300 mg/kg	2.82 ± 0.08	77.17 ± 2,17	113.3 ± 2,79	Nenhum
2.000 mg/kg	2.92 ± 0.09	81.18 ± 1,84	110.8 ± 4,17	Nenhum

Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

Tabela 3. Pesos relativos de órgãos de camundongos tratados com MEMLL nas concentrações de 300 e 2.000 mg/kg em parâmetros de toxicidade.

Grupos	Fígado	Rim	Baço	Óbitos
Controle	5.20 ± 0.22	1.65 ± 0.11	0.35 ± 0.03	0/6
300 mg/kg	5.58 ± 0.18	1.69 ± 0.08	0.34 ± 0.04	0/6
2.000 mg/kg	5.46 ± 0.18	1.70 ± 0.07	0.38 ± 0.03	0/6

Os dados representam a média ± EPM. ANOVA de uma via, seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett. Não foram encontradas diferenças significativas ($p > 0,05$) em comparação com o controle.

4.3 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.3.1 Teste de contorção por ácido acético 0,6%

Conforme os resultados obtidos com o tratamento via gavagem oral do EMFML (**Figura 13**), nas doses do EMFML 10 e 25 não apresentaram diferença significativa em relação ao veículo, entretanto, uma redução significativa na porcentagem de contorções abdominais é observada no EMFML 50 e 100 mg/kg, respectivamente 51,46% ($p < 0,05$) e 75,08% ($p < 0,001$). O medicamento padrão indometacina reduziu 78,64% ($p < 0,001$).

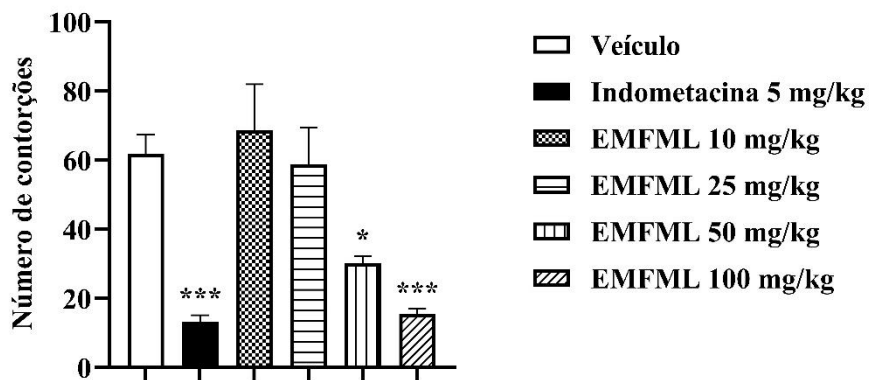


Figura 14. Efeito antinociceptivo periférico do EMFML no teste de ácido acético. Os valores representam média + SEM. ANOVA unidirecional ordinária, seguindo o teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ denota diferença estatística em comparação ao veículo.

4.3.2 Teste de placa quente

O gráfico do teste da placa quente demonstra o resultado obtido quando os animais foram tratados com o extrato (**Figura 15**). O grupo veículo manteve baixa latência em todos os momentos da análise. Os grupos EMFML tiveram aumento significativo no tempo de latência aos 30' ($p < 0,01$) e 60' ($p < 0,05$), o extrato 50 mg/kg permaneceu na placa quente, respectivamente, 164,35% e 122,92%, e o extrato 100 mg/kg apresentou, respectivamente, 162,62% e 136,63%. O grupo morfina 10 mg/kg mostrou-se eficaz quanto à duração do estímulo doloroso nos tempos 0' ($p < 0,05$), 30' ($p < 0,0001$), 60' ($p < 0,0001$) e 90' (0.001), respectivamente, 167,74%, 357,92%, 277,88% e 231,49%.

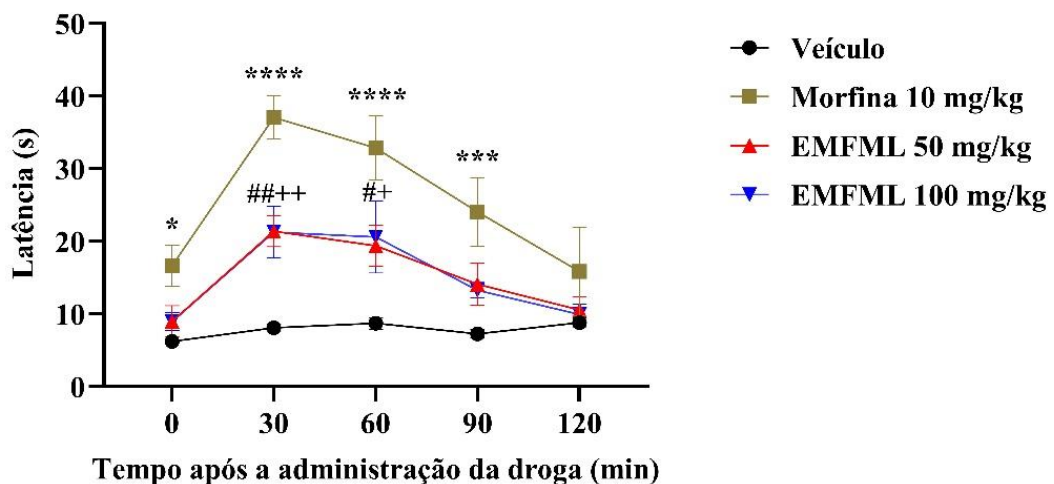


Figura 15. Efeito antinociceptivo central do EMFML no teste de placa quente. Os valores representam média + SEM. ANOVA de duas vias seguido do teste de múltiplas comparações de Dunnett. * ou + ou # significa $p < 0,05$, ** ou ++ ou ## significa $p < 0,01$, *** significa $p < 0,001$, **** significa $p < 0,0001$ denota diferença estatística em comparação com veículo.

4.3.3 Teste de nociceção induzida pela formalina 1%

O gráfico do teste da formalina (**Figura 16**) mostra os resultados obtidos quando os animais foram tratados com o extrato. Os grupos tratados foram eficientes na redução da nociceção na primeira e na segunda fase. Na fase neurogênica, o EMFML 50 e 100 mg/kg teve efeito antinociceptivo quando comparado ao grupo veículo, 35,25% ($p < 0,05$) e 52,30% ($p < 0,01$), e grupo morfina 88,48% ($p < 0,0001$). Na fase inflamatória também houve diminuição da dor, o tempo de lambida no EMFML 50 e 100 mg/kg reduziu respectivamente 66,39% ($p < 0,0001$) e 72,15% ($p < 0,0001$), e no grupo morfina 94,37% ($p < 0,0001$).

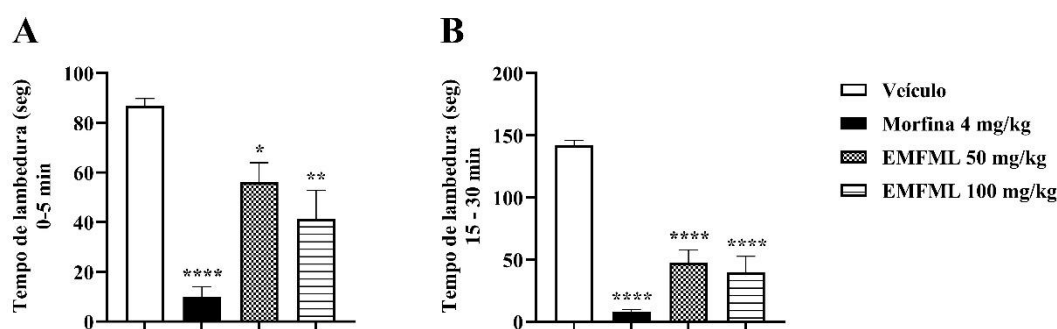


Figura 16. Efeito antinociceptivo central e periférico do EMFML no teste de formalina. A) Primeira fase, avaliação neurogênica. **B)** Segunda fase, avaliação inflamatória. Os valores representam média + SEM. ANOVA unidirecional ordinária, seguindo o teste de comparações múltiplas de Dunnett. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, **** $p < 0,0001$ denota diferença estatística em comparação ao veículo.

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais são conhecidos por suas diversidades químicas e propriedades medicinais, as quais fornecem estruturais únicas para o desenvolvimento de medicamentos. Historicamente, eles desempenharam papel fundamental na medicina moderna e permanecem como uma das principais fontes de fármacos novos e eficazes. Cerca de um terço dos medicamentos aprovados nos últimos 20 anos são advindos de produtos naturais ou seus derivados, segundo a *Food and Drug Administration* (FDA) (NAHAR; SARKER, 2020). Posto isso, este trabalho objetivou avaliar o uso etnofarmacológico da *Montrichardia linifera* a respeito do seu potencial analgésico. Para este propósito, foram realizadas a caracterização química por CLAE e RMN, avaliação da toxicidade oral aguda de acordo com a OECD e os modelos clássicos de atividade antinociceptiva no EMFML.

O CLAE é uma técnica analítica usada para separar, identificar e quantificar cada um dos componentes para obter maior clareza e confiabilidade de uma mistura. A amostra é

injetada em um sistema fechado, e por conseguinte, a fase móvel é transportada ao longo da fase estacionária ocorrendo a separação de compostos devido a diferença de afinidade (PINHEIRO et al., 2022). Assim, identificamos por meio do *fingerprinting* os flavonoides rutina, quercetina e epicatequina. Somado a isso, o RMN é uma técnica analítica capaz de determinar uma estrutura molecular e a composição química de uma amostra, atua analisando a interação dos núcleos em rotação em um forte campo magnético, a energia absorvida pela molécula induz uma transição na rotação onde posteriormente é avaliado (SINGH; DHEPE, 2018). Desse modo, reforçamos novamente a presença da rutina e da quercetina, e identificamos mais os flavonoides luteolina e crisoeriol.

Comumente conhecida como vitamina P, a rutina é um glicosídeo flavonoide que tem sido relatado como anti-inflamatório, antidiabético, cardioprotetor, hepatoprotetor, anticancerígeno, neuroprotetor (TOBAR-DELGADO et al., 2023), antioxidante, citoprotetor, vasoprotetor, anticarcinogênico e antinociceptivo (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017). A quercetina é o flavonoide mais abundante na natureza e possui muitas propriedades farmacológicas importantes, como atividades anti-inflamatórias, antivirais, antineoplásicas, cardioprotetoras, antitumorais, antiobesidade, antibacterianas (GANESHPURKAR; SALUJA, 2017; SEPTEMBRE-MALATERRE et al., 2022), antioxidantes e antinociceptivas (AZEVEDO et al., 2013). A epicatequina é um dos polifenóis vegetais mais presentes na dieta humana, possui atividade antioxidante, anti-inflamatória, melhora do desempenho muscular, antidiabetes, cardioprotetora, neuroprotetora, renalprotetora, anticancerígena, antiviral e antinociceptiva (QU et al., 2021). A luteolina é conhecida por suas propriedades antiapoptóticas, anti-inflamatórias (HE; CHEN, 2021), antimicrobianas, antivirais, anticancerígenas, antioxidantes, hepatoprotetoras, antialérgicas, neuroprotetoras, cardioprotetoras, cicatrizantes, antienvelhecimento (SINGH et al., 2024) e antinociceptivas (ZHOU et al., 2022). O crisoeriol possui diversas propriedades biológicas com potencial farmacológico, como atividade anticancerígena, anti-inflamatória, antidiabética, anti-hiperlipidêmica, antioxidante, antimicrobiana, cardioprotetora, anti-osteoporose, neuroprotetora, anti-inseticida, antiartrite (ABOULAGHRAS et al., 2022), antitrombótica e antinociceptiva (LAW et al., 2024).

Os flavonoides são metabólitos secundários que desempenham papéis importantes para o ser humano, por isso, diversas pesquisas foram realizadas nas últimas décadas relacionando o seu consumo com a saúde. Eles são considerados promissores visto que geralmente estão associados a efeitos positivos e por não apresentarem efeitos tóxicos, uma vez que são habitualmente consumidos (GALATRO et al., 2024). Por essa razão, acredita-se

que os extratos de plantas tenham menos efeitos adversos do que os medicamentos convencionais. Entretanto, a compreensão sobre os produtos naturais é necessário para garantir que não resultem em impactos negativos aos seres humanos (CRISTINA DA COSTA ARALDI et al., 2021).

O teste de toxicidade oral aguda é um experimento que antecede a execução dos testes farmacológicos, sendo importante para a obtenção de dados preliminares quanto os efeitos tóxicos de uma substância, e por conseguinte, prevenir danos ao ser administrado. Não foram registrados alterações ganho de peso, consumo de comida, água dos animais e sintomas de toxicidade. Assim como, não houve registro de alteração no peso relativo dos órgãos ou óbitos dos animais. Os resultados obtidos revelam que a DL_{50} do EMFML é superior a 2.000 mg/kg. De acordo com o método de categorização dos agentes orais da diretriz 423 da OCDE, drogas com DL_{50} entre 2.000 e 5.000 mg/kg são considerado de categoria 5, indicando baixa toxicidade oral aguda. Este é o primeiro relato da toxicidade das folhas de *Montrichardia linifera in vivo*.

Além disso, avaliamos os efeitos antinociceptivos do EMFML nos testes de ácido acético, placa quente e formalina. O teste de contorções com ácido acético é usado para avaliar a atividade analgésica de base inflamatória de um medicamento potencial (DE JESUS et al., 2023). Neste modelo de nocicepção, a intensidade do estímulo doloroso é proporcional ao número de contorções abdominais (DA FONSECA et al., 2021). A resposta de contorção física envolve a conversão de ácido araquidônico em eicosanoides por lipoxigenases (LOX) e ciclooxigenases (COX), que causam hiperalgesia ao sensibilizar os neurônios periféricos da dor (ALQUDAH et al., 2023; OQAL et al., 2023). Os eicosanoides são responsáveis pela sinalização celular e pela resposta inflamatória através da liberação de prostaglandinas, principalmente a prostaglandina E2 (PGE2), que está relacionada a circunstâncias patológicas (SILVA et al., 2023).

O estudo de Mohanty et al. (2015) demonstrou que os compostos ativos rutina e quercetina da espécie *Leptadenia reticulata* inibem a biossíntese de eicosanoides e seus respectivos produtos finais e pode ser a capacidade de inibir a infiltração de neutrófilos e sua degranulação, diminuindo o nível de ácido araquidônico responsável pela sensação dolorosa. Além disso, a epicatequina é um dos principais flavonoides da espécie *Litchi chinensis* que apresenta efeitos antinociceptivos periféricos e seu mecanismo de ação provavelmente está envolvido na inibição da atividade da COX e PGE2 no líquido peritoneal e na inativação do sistema glutamatérgico (CASTELLAIN et al., 2014). Os compostos identificados luteolina e crisoeiriol da espécie *Passiflora foetida* foram observados como anti-inflamatórios em outros

testes, mas também mostraram inibição da COX e atenuação da PGE2 (CHIAVAROLI et al., 2020).

Estes resultados do teste do ácido acético estão intimamente associados aos compostos do EMFML, pois todos os flavonoides identificados possuem efeitos anti-inflamatórios e pode estar inibido a nocicepção ao suprimir os níveis periféricos de LOX e COX, reduzindo a produção de mediadores inflamatórios como a PGE2. Na literatura científica há apenas um estudo antinociceptivo com o gênero *Montrichardia* Crueg, no qual foram utilizados 400 mg/kg do extrato etanólico do caule de *Montrichardia linifera*, onde identificado a presença de flavonoides, reduzindo cerca de 90.6% das contorções (SILVA et al., 2013). Além disso, relatamos pela primeira vez que o EMFML apresenta uma curva de inibição relacionada à dose.

O teste da placa quente é um modelo amplamente utilizado para avaliar efeitos antinociceptivos no sistema nervoso central, como opioides, por meio de estimulação térmica (ASIRI et al., 2024). Neste teste, os animais são colocados em uma placa quente a uma temperatura fixa onde o tempo de resposta da lambida da pata é observado, o que requer coordenação do sistema nervoso central (XIE et al., 2023). A ativação do potencial receptor transitório vanilóide 1 (TRPV1) ocorre nos nociceptores quando há estímulo térmico em 43°C (BARBOSA et al., 2023). A ativação das fibras nociceptoras A δ e C permite que a transmissão do potencial de ação ocorra através do corno dorsal para o tálamo e subsequentemente para o córtex somatossensorial primário (AL-CHALABI; REDDY; GUPTA, 2024).

No estudo realizado por Castellain et al. (2014), o flavonoide epicatequina foi identificado na espécie *Litchi chinensis* e relatado como um dos principais compostos pelo significativo efeito central, possivelmente devido ao efeito inibitório apresentado contra a transmissão nociceptiva mediada pelo TRPV1 e inativação do sistema glutamatérgico. Além disso, Jaffal et al. (2020) identificaram os flavonoides rutina, quercetina e crisoeriol na espécie *Moringa peregrina* que apresentaram efeitos antinociceptivos centrais no mesmo teste e também comprovaram sua ação nos receptores α_2 por vias adrenérgicas. Por fim, o estudo de Fan et al. (2018) com o composto isolado luteolina confirma seu efeito antinociceptivo central, porém seu mecanismo de ação não foi estabelecido. Esses dados do EMFML no teste de placa quente estão relacionados aos compostos identificados. Este é o primeiro relato de ação antinociceptiva central da espécie *Montrichardia linifera* no teste de placa quente.

Para corroborar com os efeitos analgésicos centrais e periféricos do EMFML, foi realizado o teste da formalina. É muito utilizado em roedores, causando estímulos dolorosos

na região intraplantar da pata traseira do animal. O teste apresenta dois tipos de nocicepção, dor neurogênica (0-5 minutos) e dor inflamatória (15-30 minutos) (GAMMOH et al., 2023). A primeira fase ocorre através da estimulação direta da formalina nos nociceptores aferentes primários, liberando bradicinina e substância P (ALQUDAH et al., 2023; SANTOS et al., 2024). A segunda fase ocorre através da liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, serotonina e bradicinina no local da lesão (TODOROV et al., 2024).

A lambida é percebida após a injeção da substância química que corresponde à resposta dolorosa, a primeira fase é transmitida diretamente ao sistema nervoso central, posteriormente, a segunda fase é a presença de mediadores inflamatórios no local da lesão (HIROTA; KOYAMA; SHIMADA, 2023). Os flavonoides do EMFML são responsáveis pela atividade antinociceptiva em ambas as fases deste teste, pois demonstraram efeitos antinociceptivos observados no teste da placa quente e no teste do ácido acético, respectivamente. Os mecanismos de ação são provavelmente os mesmos descritos nos testes de placa quente e do ácido acético. Este é o primeiro relato da espécie *Montrichardia linifera* com o teste de nocicepção da formalina.

6 CONCLUSÃO

O EMFML demonstrou efeitos analgésicos centrais e periféricos em testes experimentais. Esta atividade se deve ao fato de todos os flavonoides identificados demonstrarem diversas propriedades biológicas, com efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antinociceptivos em comum. Além disso, o EMFML não apresentou efeitos tóxicos ou mortalidade. O presente estudo relata pela primeira vez a caracterização química, avaliação da toxicidade oral aguda, inibição do ácido acético relacionada à dose resposta e efeitos antinociceptivos em testes de placa quente e formalina de *Montrichardia linifera*. Portanto, esses dados validam o uso na etnofarmacologia brasileira e fornecem informações para estudos futuros mais detalhados para determinar suas vias específicas.

REFERÊNCIAS

- ABOULAGHRAS, S. et al. Health Benefits and Pharmacological Aspects of Chrysoeriol. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 8, p. 973, 7 ago. 2022.
- AL-CHALABI, M.; REDDY, V.; GUPTA, S. **Neuroanatomy, Spinothalamic Tract**. [s.l: s.n.].
- AL-CHALABI, M.; REDDY, V.; GUPTA, S. **Neuroanatomy, Spinothalamic Tract**. [s.l: s.n.].
- ALQUDAH, A. et al. Lysionotin exerts antinociceptive effects in various models of nociception induction. **Heliyon**, v. 9, n. 4, p. e15619, abr. 2023.
- AMARAL, A. C. F. et al. **A Fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisas de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos**. 1. ed. [s.l.] Ministério da Saúde, 2006.
- AMARANTE, C. B. et al. Caracterização física, química e nutricional dos frutos da Aninga. **Planta Daninha**, v. 29, n. 2, p. 295–303, jun. 2011a.
- AMARANTE, C. B. DO et al. Avaliação da composição mineral do chá da folha senescente de *Montrichardia linifera* (arruda) schott (araceae) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 419–423, 2011b.
- ANAND, J. P.; MONTGOMERY, D. Multifunctional Opioid Ligands. Em: [s.l: s.n.]. p. 21–51.
- ARMSTRONG, S. A.; HERR, M. J. **Physiology, Nociception**. [s.l: s.n.].
- ASIRI, S. A. et al. Evaluation of *Habenaria aitchisonii* Reichb. for antioxidant, anti-inflammatory, and antinociceptive effects with in vivo and in silico approaches. **Frontiers in Chemistry**, v. 12, 19 mar. 2024.
- AZEVEDO, M. I. et al. The Antioxidant Effects of the Flavonoids Rutin and Quercetin Inhibit Oxaliplatin-Induced Chronic Painful Peripheral Neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, p. 1744–8069-9–53, 1 jan. 2013.
- BARBOSA, A. G. R. et al. Screening of the action mechanisms involved in the antinociceptive effect of isopulegol and its complex in cyclodextrin using acute nociception models in mice. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, v. 6, p. 100383, dez. 2023.
- BARBOSA, T. A. P.; MONTAG, L. F. A. The role of *Lithodoras dorsalis* (Siluriformes: Doradidae) as seed disperser in Eastern Amazon. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 2, 2017.
- BATISTA, R. J. D. R. et al. Constituintes voláteis da raiz e do rizoma de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi - Ciências Naturais**, v. 14, n. 2, p. 197–207, 27 ago. 2019.

BATISTA, R. J. DA R. et al. Constituintes voláteis da inflorescência de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott. **Brazilian Journal of Development**, v. 9, n. 11, p. 30244–30255, 24 nov. 2023.

BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic Anatomy and Physiology of Pain Pathways. **Neurosurgery Clinics of North America**, v. 25, n. 4, p. 629–638, out. 2014.

BRASIL. Aprova a Política Nacional de Plantas medicinais e Fitoterápicos. **Diário da União**, 23 jun. 2006.

CAMELO, M. DE C. et al. Araceae do Parque Nacional do Caparaó, MG-ES, Brasil. **Rodriguésia**, v. 71, 2020.

CASTELLAIN, R. C. L. et al. Chemical composition, antioxidant and antinociceptive properties of *Litchi chinensis* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 66, n. 12, p. 1796–1807, 16 nov. 2014.

CATLEY, M. J.; MOSELEY, G. L.; JONES, M. A. Understanding Pain in Order to Treat Patients in Pain. Em: **Clinical Reasoning in Musculoskeletal Practice**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 32–46.

CHAUVET, A. Anatomy and Physiology of Neurogenic Pain. **Advances in Small Animal Medicine and Surgery**, v. 33, n. 1, p. 1–3, jan. 2020.

CHIAVAROLI, A. et al. Pharmacological Properties and Chemical Profiles of *Passiflora foetida* L. Extracts: Novel Insights for Pharmaceuticals and Nutraceuticals. **Processes**, v. 8, n. 9, p. 1034, 24 ago. 2020.

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, maio 2021.

COSTA, E. S. S. et al. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos, atividade antiplasmódica e toxicidade em *Artemia salina* de extrato etanólico de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott, Araceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 834–838, dez. 2009.

CRISTINA DA COSTA ARALDI, I. et al. Preclinical safety assessment of the crude extract from *Sida rhombifolia* L. aerial parts in experimental models of acute and repeated-dose 28 days toxicity in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 124, p. 104974, ago. 2021.

CRUZ NETO, M. S. DA et al. Práticas de utilização de plantas medicinais na atenção básica: uma revisão da literatura. Em: **Práticas Integrativas e Complementares: visão holística e multidisciplinar - Volume 3**. [s.l.] Editora Científica Digital, 2023. p. 68–78.

DA COSTA GUIMARÃES, N. et al. Evaluation of the anti-snakebite, antimicrobial and antioxidant potential of *Philodendron megalophyllum* Schott (Araceae), traditionally used in accidents caused by snakes in the western region of Pará, Brazil. **Toxicon**, v. 184, p. 99–108, set. 2020.

DA FONSECA, A. et al. PA-Int5: An isatin-thiosemicarbazone derivative that exhibits anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in Swiss mice. **Biomedical Reports**, v. 15, n. 1, p. 61, 26 maio 2021.

DAVIDSON, S.; MOSER, H.; GIESLER, G. **Ascending Pathways for Itch**. [s.l.: s.n.].

DE JESUS, E. N. S. et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory activities of the curzerene type essential oil of *Eugenia uniflora* from Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 317, p. 116859, dez. 2023.

DE VERAS, B. O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of essential oil of the leaves of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith. from the semi-arid region of Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 317, p. 116858, dez. 2023.

DÍAZ-JIMÉNEZ, P.; GUADARRAMA-OLIVERA, M. DE LOS A.; CROAT, T. B. Diversidad florística de Araceae en el estado de Tabasco, México. **Botanical Sciences**, v. 93, n. 1, p. 131–142, 15 fev. 2015.

DOGRUL, A. et al. Involvement of descending serotonergic and noradrenergic pathways in CB1 receptor-mediated antinociception. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 38, n. 1, p. 97–105, jul. 2012.

EIDELMAN, A.; CARR, D. B. Taxonomy of Cancer Pain. Em: **Cancer Pain**. [s.l.] Elsevier, 2006. p. 3–12.

FAN, X. et al. Evaluation of Anti-Nociceptive and Anti-Inflammatory Effect of Luteolin in Mice. **Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology**, v. 37, n. 4, p. 351–364, 2018.

FENTON, B. W.; SHIH, E.; ZOLTON, J. The neurobiology of pain perception in normal and persistent pain. **Pain Management**, v. 5, n. 4, p. 297–317, jul. 2015.

FERREIRA, F. A. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Portulaca pilosa* L.** Belém: Universidade Federal do Pará, 2012.

FILLINGIM, R. B. Individual differences in pain: understanding the mosaic that makes pain personal. **Pain**, v. 158, n. 1, p. S11–S18, 24 abr. 2017.

FRAUSIN, G. et al. Plants of the Araceae family for malaria and related diseases: a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 657–666, dez. 2015.

GALATRO, A. et al. Plants as a source of dietary bioactives: Flavonoids and basis for their health benefits. **Aspects of Molecular Medicine**, v. 4, p. 100048, dez. 2024.

GAMMOH, O. S. et al. Evaluation of the antinociceptive effect of valerian and hops combination in experimental animal models: Involvement of the opioid system. **Heliyon**, v. 9, n. 3, p. e14185, mar. 2023.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 25, n. 2, p. 149–164, fev. 2017.

GIERTHMÜHLEN, J.; BARON, R. Neuropathic Pain. **Seminars in Neurology**, v. 36, n. 05, p. 462–468, 23 set. 2016.

GLARE, P.; AUBREY, K. R.; MYLES, P. S. Transition from acute to chronic pain after surgery. **The Lancet**, v. 393, n. 10180, p. 1537–1546, abr. 2019.

HAIGH, A. L. et al. Target sequence data shed new light on the infrafamilial classification of Araceae. **American Journal of Botany**, v. 110, n. 2, 5 fev. 2023.

HE, H.; CHEN, X. Luteolin attenuates cognitive dysfunction induced by chronic cerebral hypoperfusion through the modulation of the PI3K/Akt pathway in rats. **Journal of Veterinary Research**, v. 65, n. 3, p. 341–349, 5 jul. 2021.

HENRIQUEZ, C. L. et al. Phylogenomics of the plant family Araceae. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 75, p. 91–102, jun. 2014.

HENRIQUEZ, C. L. et al. Evolutionary dynamics of chloroplast genomes in subfamily Aroideae (Araceae). **Genomics**, v. 112, n. 3, p. 2349–2360, maio 2020.

HIROTA, I.; KOYAMA, Y.; SHIMADA, S. Histochemical analysis of the biphasic properties of formalin pain-induced behavior. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 34, p. 101467, jul. 2023.

HUANG, E. High Performance Liquid Chromatography (HPLC).
https://app.biorender.com/profile/eunice_huang/templates/62050a2007186500a447eb09. 2022.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103–114, jul. 1987.

JAFFAL, S. M. et al. Antinociceptive Action of *Moringa peregrina* is Mediated by Interaction with α 2-Adrenergic Receptor. **Balkan Medical Journal**, 5 mar. 2020.

JIN, Q. Q. et al. Somatotopic Representation of Second Pain in the Primary Somatosensory Cortex of Humans and Rodents. **The Journal of Neuroscience**, v. 38, n. 24, p. 5538–5550, 13 jun. 2018.

JOHNSON, A. C.; GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. The Pharmacology of Visceral Pain. Em: [s.l: s.n.]. p. 273–301.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.

LAW, S. K. et al. Pharmacological Activities of *Lonicerae japonicae* flos and Its Derivative—“Chrysoeriol” in Skin Diseases. **Molecules**, v. 29, n. 9, p. 1972, 25 abr. 2024.

LIGHT, A. R. Normal Anatomy and Physiology of the Spinal Cord Dorsal Horn. **Stereotactic and Functional Neurosurgery**, v. 51, n. 2–5, p. 78–88, 1988.

LIMA, C. et al. Antibacterial, Antibiofilm, and Antischistosomal Activity of *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) Leaf Extracts. **Scientia Pharmaceutica**, v. 89, n. 3, p. 31, 5 jul. 2021.

LOPES, A. et al. Modeling of regional- and local-scale distribution of the genus *Montrichardia* Crueg. (Araceae). **Hydrobiologia**, v. 789, n. 1, p. 45–57, 8 mar. 2017.

LOPES, A.; PAROLIN, P.; PIEDADE, M. T. F. Morphological and physiological traits of aquatic macrophytes respond to water chemistry in the Amazon Basin: an example of the genus *Montrichardia* Crueg (Araceae). **Hydrobiologia**, v. 766, n. 1, p. 1–15, 19 fev. 2016.

LOPES, P. S. S. et al. Motor cortex and pain control: exploring the descending relay analgesic pathways and spinal nociceptive neurons in healthy conscious rats. **Behavioral and Brain Functions**, v. 15, n. 1, p. 5, 25 dez. 2019.

LOPEZ-ALVAREZ, V. M. et al. Monoaminergic descending pathways contribute to modulation of neuropathic pain by increasing-intensity treadmill exercise after peripheral nerve injury. **Experimental Neurology**, v. 299, p. 42–55, jan. 2018.

MACDONALD, A. D. et al. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 1, n. 1, p. 4–14, mar. 1946.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, n. 4, p. 320–332, 1962.

MCCARBERG, B.; PEPPIN, J. Pain Pathways and Nervous System Plasticity: Learning and Memory in Pain. **Pain Medicine**, v. 20, n. 12, p. 2421–2437, 1 dez. 2019.

MIROUZE, E.; STAQUET, A.; VERY, R. Morphometric and morphological analyses of leaves in two species of Araceae : *Montrichardia linifera* and *Montrichardia arborescens* among different French Guiana populations. **Journal of Ecofog**, v. 3, p. 1–15, 2012.

MOHANTY, S. K. et al. Analgesic, Anti- inflammatory, Anti- lipoxygenase Activity and Characterization of Three Bioactive Compounds in the Most Active Fraction of *Leptadenia reticulata* (Retz.)Wight & Arn. - A Valuable Medicinal Plant. **Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR**, v. 14, n. 3, p. 933–42, 2015.

MOSIŃSKA, P.; ZIELIŃSKA, M.; FICHNA, J. Expression and physiology of opioid receptors in the gastrointestinal tract. **Current Opinion in Endocrinology, Diabetes & Obesity**, v. 23, n. 1, p. 3–10, fev. 2016.

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

NAHAR, L.; SARKER, S. D. Medicinal natural products—An introduction. Em: [s.l: s.n.]. p. 1–44.

ÖHLMANN, H. et al. Distinct Alterations in Central Pain Processing of Visceral and Somatic Pain in Quiescent Ulcerative Colitis Compared to Irritable Bowel Syndrome and Health. **Journal of Crohn's and Colitis**, v. 17, n. 10, p. 1639–1651, 8 nov. 2023.

OQAL, M. et al. Analgesic effect of the flavonoid herbacetin in nociception animal models. **European review for medical and pharmacological sciences**, v. 27, n. 23, p. 11236–11248, dez. 2023.

PANTOJA, G. F. et al. Uso e aplicações medicinais da mamorana (>Pachira aquatica Aublet) pelos ribeirinhos de São Lourenço, Igarapé-Miri, estado do Pará, Amazônia. **Interações (Campo Grande)**, p. 647–662, 16 set. 2020.

PANTOJA, P. O. Comparação ecofisiológica e de atributos de crescimento das herbáceas aquáticas *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott e *M. arborescens* (L.) Schott em tipologias alagáveis contrastantes na Amazônia central. 2011.

PEDROSO, R. DOS S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, 2021.

PETROIANU, G. A.; ALOUM, L.; ADEM, A. Neuropathic pain: Mechanisms and therapeutic strategies. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, v. 11, 16 jan. 2023.

PINHEIRO, W. B. S. et al. The use of *Bagassa guianensis* aubl. forestry waste as an alternative for obtaining bioproducts and bioactive compounds. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 15, n. 6, p. 103813, jun. 2022.

PREUSS, C. V.; KALAVA, A.; KING, K. C. **Prescription of Controlled Substances: Benefits and Risks**. [s.l.: s.n.].

QU, Z. et al. Advances in physiological functions and mechanisms of (–)-epicatechin. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 61, n. 2, p. 211–233, 19 jan. 2021.

RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. **Pain**, v. 161, n. 9, p. 1976–1982, set. 2020.

ROCHA, L. P. B. DA et al. Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282, 5 ago. 2021.

SANTOS, P. V. L. et al. Exploring the impact of seasonal variations on the chemical composition, antinociceptive, and anti-inflammatory properties of *Pogostemon heyneanus* Benth. essential oil. **Frontiers in Pharmacology**, v. 15, 1 fev. 2024.

SEPTEMBRE-MALATERRE, A. et al. Focus on the high therapeutic potentials of quercetin and its derivatives. **Phytomedicine Plus**, v. 2, n. 1, p. 100220, fev. 2022.

SHANG, Y.; FILIZOLA, M. Opioid receptors: Structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. **European Journal of Pharmacology**, v. 763, p. 206–213, set. 2015.

SILVA, J. V. DA S. et al. A bibliographic review on the family Araceae with foccus on the genera *Pistia*, *Philodendron* and *Montrichardia* : botanical, phytochemical and biological activity aspects. **Revista Fitos**, v. 8, n. 2, 2013.

SILVA, V. B. G. et al. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice of the essential oil of *Psidium cattleianum* Sabine leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 312, p. 116443, ago. 2023.

SÍMARO, G. V. **Avaliação das atividades citotóxica, anti-inflamatória e antinociceptiva da oleoresina de *Copaifera pubiflora* Benth e de seu metabólito majoritário ácido ent-hardwíckiico**; Ribeirão Preto: Universidade de São Paulo, 31 maio 2021.

SINGH, A. et al. Harnessing Luteolin's therapeutic potential in human disorders: Medicinal significance, biological, clinical properties and analytical aspects. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 10, p. 100401, mar. 2024.

SINGH, S. K.; DHEPE, P. L. Experimental evidences for existence of varying moieties and functional groups in assorted crop waste derived organosolv lignins. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 144–151, set. 2018.

SODHI, R. K. et al. Intersections in Neuropsychiatric and Metabolic Disorders: Possible Role of TRPA1 Channels. **Frontiers in Endocrinology**, v. 12, 29 nov. 2021.

SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO, D. et al. TRPA1 as a therapeutic target for nociceptive pain. **Expert Opinion on Therapeutic Targets**, v. 24, n. 10, p. 997–1008, 2 out. 2020.

TAO, Z.-Y.; TRAUB, R. J.; CAO, D.-Y. Epigenetic Modulation of Visceral Pain. Em: **Epigenetics of Chronic Pain**. [s.l.] Elsevier, 2019. p. 141–156.

Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method. [s.l.] OECD, 2002.

TOBAR-DELGADO, E. et al. Rutin: Family Farming Products' Extraction Sources, Industrial Applications and Current Trends in Biological Activity Protection. **Molecules**, v. 28, n. 15, p. 5864, 3 ago. 2023.

TODOROV, P. et al. Synthesis, molecular docking, electrochemical and fluorimetric analysis of new caffeic and cinnamic acid-conjugated hemorphin derivatives designed as potential anticonvulsant and antinociceptive agents. **Bioorganic Chemistry**, v. 143, p. 107063, fev. 2024.

TURNATURI, R. et al. From Plant to Chemistry: Sources of Antinociceptive Non-Opioid Active Principles for Medicinal Chemistry and Drug Design. **Molecules**, v. 29, n. 4, p. 815, 9 fev. 2024.

VAN OUDENHOVE, L. et al. Common and distinct neural representations of aversive somatic and visceral stimulation in healthy individuals. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 5939, 23 nov. 2020.

- VARGAS-RUIZ, R. et al. Bio-guided study of the antinociceptive, anti-inflammatory, and free-radical scavenging capacity of the leaves of *Rhus virens* Lindh. ex A. Gray and its possible mechanism of antinociception. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 300, p. 115756, jan. 2023.
- WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid Receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, n. 1, p. 953–990, jun. 2004.
- WANG, V. C.; MULLALLY, W. J. Pain Neurology. **The American Journal of Medicine**, v. 133, n. 3, p. 273–280, mar. 2020.
- WEBB, C. M.; STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Clinics in Integrated Care**, v. 14, p. 100115, out. 2022.
- WFO. **Montrichardia linifera (Arruda) Schott**. Disponível em: <<http://www.worldfloraonline.org/taxon/wfo-0000245850>>. Acesso em: 1 abr. 2024.
- WOLF, A. et al. Efficacy, safety, and side effects of oliceridine in acute postoperative pain, a protocol for a systematic review and meta-analysis. **PLOS ONE**, v. 19, n. 2, p. e0299320, 29 fev. 2024.
- WOODLEY, S. **NMR principles**. Disponível em: <https://app.biorender.com/profile/steve_woodley/templates/65117eb0dfbb15fc06b7e49b>. Acesso em: 21 jun. 2024.
- XIE, Y.-Q. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of *Streblus indicus*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 14, 27 set. 2023.
- YEN, C.-T.; LU, P.-L. Thalamus and pain. **Acta Anaesthesiologica Taiwanica**, v. 51, n. 2, p. 73–80, jun. 2013.
- ZANDONADI MENEGUELLI, A. et al. Ethnopharmacological and botanical evaluation of medicinal plants used by Brazilian Amazon Indian community. **Interações (Campo Grande)**, p. 633–645, 16 set. 2020.
- ZHOU, Y.-S. et al. Luteolin relieves lung cancer-induced bone pain by inhibiting NLRP3 inflammasomes and glial activation in the spinal dorsal horn in mice. **Phytomedicine**, v. 96, p. 153910, fev. 2022.