

# Avaliação da ação opióide periférica do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax (cola-nota).

**OLIVEIRA**, Rodrigo Borges de<sup>a\*</sup>, **NASCIMENTO**, Marcus Vinicius Mariano<sup>b</sup>,  
**VALADARES**, Marize Campos<sup>a</sup>, **PAULA**, José Realino<sup>a</sup>,  
**COSTA**, Elson Alves da<sup>b</sup>, **CUNHA**, Luiz Carlos da<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Núcleo de Pesquisas e Estudos Tóxico-Farmacológico, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia

<sup>b</sup> Lab. de Farmacologia de Produtos Naturais, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia

*Palavras-Chave:* *Synadenium umbellatum* Pax.; Extrato etanólico; Atividade anti-nociceptiva; Agonista opióide periférico.

## 1. Introdução

Várias espécies de *Synadenium* (família Euphorbiaceae) são conhecidas no mundo pelo seu uso como antiinflamatório, anticâncer e analgésico. No centro-oeste, o látex do *Synadenium umbellatum* Pax. (cola-nota) tem sido utilizado popularmente para o tratamento de várias enfermidades, tais como, alergia, câncer, chagas, diabetes, gripe, hemorragias internas, impotência sexual, lepra, obesidade, úlcera nervosa, cólicas menstruais e dores no corpo (ORTENCIO, 1997). Baseando-se na utilização popular do *Synadenium umbellatum* para cólicas menstruais e dores no corpo resolvemos estudar as sua atividade antinociceptiva.

## 2. Materiais e Métodos

### 2.1. Material botânico

Folhas de *S. umbellatum* foram coletadas no bairro Feliz, Goiânia-GO, no verão de 2006. O material botânico foi identificado pelo Professor Dr. José Realino de Paula e uma exsicata mantida no herbário da UFG sob número UFG-27160.

### 2.2. Preparação do extrato etanólico

As folhas de *S. umbellatum* foram secas a 40 °C em estufa com circulação de ar por uma semana. Após a secagem e trituração, o extrato etanólico de *S. umbellatum* (EES) foi produzido por maceração exaustiva utilizando-se etanol 96°GL P.A. O extrato foi concentrado em rotaevaporador. Para auxiliar na solubilização dos extratos, foi utilizado Tween 80.

### 2.3. Animais

Os animais utilizados neste estudo foram camundongos machos Swiss, pesando entre 25 e 35 g obtidos no Biotério Central da UFG.

### 2.4. Drogas

Para todos os ensaios, uma solução de extrato etanólico de *S. umbellatum* a 10 mg/mL foi preparada imediatamente antes dos experimentos e, a partir desta solução, foram feitas sucessivas diluições a fim de se obter todas as concentrações desejadas. Outras drogas usadas foram indometacina (solubilizada em NaHCO<sub>3</sub> 5%), morfina e fentanil (ambas solubilizadas em salina). Todas as drogas utilizadas foram injetadas na quantidade de 10 mL/kg independente da via de administração.

\* Autor para correspondência: Tel. + 55 62 35211118

E-mail: rodrigolevita@yahoo.com.br (R.B. Oliveira)

## 2.5. Atividade anti-nociceptiva em camundongos

### 2.5.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Empregando-se a metodologia de Collier *et al.* (1968), foram utilizados grupos experimentais de 6 camundongos que foram tratados pela via p.o. com veículo (grupo controle), EES (25, 50 ou 100 mg/kg) ou indometacina (10 mg/kg, controle positivo). Todos os grupos receberam ácido acético 1,2% v/v i.p. uma hora após os tratamentos. O número de contorções abdominais foi contado acumulativamente em 30 minutos de avaliação experimental e comparadas estatisticamente em relação ao grupo controle.

### 2.5.2. Teste da formalina

Este teste avalia dois tipos de dor: a de origem neurogênica, que ocorre pela estimulação direta de terminações nociceptivas, e a de origem inflamatória, produzida pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR *et al.*, 1985).

Foram utilizados grupos experimentais de 6 camundongos tratados pela via oral com veículo, EES (100 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou morfina (10 mg/kg, s.c.). 1 hora após os tratamentos, os animais foram injetados na região intraplantar da pata posterior direita com 20  $\mu$ L de formalina 3% v/v (formaldeído 1,2%). Em seguida, os animais foram observados individualmente durante 30 min em caixas de acrílico com fundo especular para auxiliar a visualização. Em seguida à aplicação da formalina, foi medida a reatividade do animal considerada como o tempo, em segundos, que o animal permanece lambendo a pata injetada. O efeito antinociceptivo foi avaliado nas duas fases da dor: durante os primeiros 5 minutos (dor neurogênica) e no período de 15 a 30 minutos (dor de origem inflamatória), sendo os resultados expressos como as médias dos tempos de reatividade nas distintas fases, comparativamente ao grupo experimental controle.

### 2.5.3. Influência do tratamento com naloxona

Os animais foram tratados previamente com salina ou com naloxona (3 mg/kg), um antagonista opióide não seletivo, 15 minutos antes dos tratamentos com o veículo, EES (100 mg/kg) ou com o fentanil (100  $\mu$ g/kg), controle positivo do teste. Decorridos 30 min (s.c.) ou 60 min. (p.o.) dos tratamentos, os animais foram injetados com ácido acético (1,2% i.p.) e o número de contorções abdominais foi contado por 30 minutos à semelhança do item 2.5.1.

### 2.5.4. Teste do tail flick

Segundo D'Amour e Smith (1941), este ensaio permite o estudo de drogas com atividade opióide central, mediante a avaliação do tempo, que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência de um estímulo térmico doloroso. Este estímulo foi produzido por imersão do terço distal da cauda dos camundongos em banho-maria a  $55,5 \pm 0,5$  °C.

Grupos experimentais de 6 animais foram previamente selecionados quanto à sua reatividade ao estímulo nociceptivo, não sendo utilizados animais cujo tempo de resposta foi superior a 7 segundos. A reatividade foi medida a cada 30 minutos, iniciando-se uma hora antes e prolongando-se por 2 horas depois da administração p.o. do veículo ou do EES (25, 50 ou 100 mg/kg). Morfina (10 mg/kg, s.c.) foi utilizada como controle positivo do ensaio. O tempo máximo que se deixou as caudas dos animais em contato com o banho-maria foi de 20 s para se evitar lesões.

## 2.6. Análise estatística

Os resultados foram expressos como médias  $\pm$  erro padrão das médias. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Turkey, considerando-se como significantes valores de  $P < 0,05$ .

## 3. Resultados e Discussão

O EES exibiu significativa supressão do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em uma relação dose-resposta em camundongos se comparados ao grupo controle (Fig. 1A). No grupo controle, previamente tratado com veículo, a injeção de ácido acético i.p. induziu  $77,3 \pm 2,1$  contorções em 30 min. O pré-tratamento com EES (25, 50 ou 100 mg/kg) reduziu as contorções abdominais em 24,7% ( $58,2 \pm 1,0$ ), 39,5% ( $46,8 \pm 0,9$ ) e 55,0% ( $34,8 \pm 1,5$ ), respectivamente. O pré-tratamento com indometacina (10 mg/kg) reduziu as contorções em 39,6% ( $46,7 \pm 0,7$ ). A DE50 (dose efetiva mediana) calculada, foi de 80,7 mg/kg (Fig. 1B).

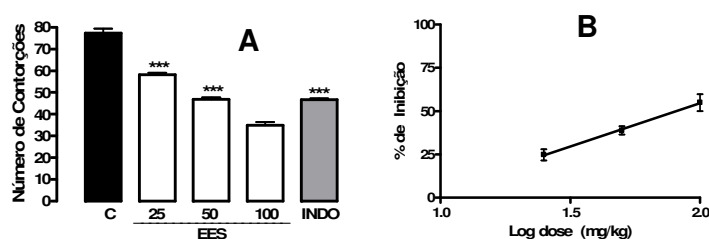


Figura 1 – (A) Efeito do EES (mg/kg) no número médio de contorções abdominais induzidas por ácido acético em trinta minutos  $\pm$  EPM para cada grupo de tratamento (n=6). "C" refere-se ao grupo controle. (B) Gráfico Log dose x Resposta (% de inibição do número de contorções). Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação com o grupo controle, \*\*\*  $P < 0,001$ .

O extrato etanólico de *Synadenium umbellatum* inibiu ambas as fases do teste da formalina. Na primeira fase do teste, o tempo (segundos) gasto lambendo a pata no grupo controle foi de  $119,4 \pm 12,2$ . O tempo no grupo tratado com EES 100 mg/kg foi de  $61,3 \pm 5,4$ , enquanto para os grupos tratados com morfina e indometacina foi de  $33,3 \pm 15,8$  e  $106,3 \pm 10,4$  respectivamente (Fig. 2A). Na segunda fase, o tempo (segundos) para o grupo controle foi de  $271,6 \pm 31,5$ . Para o grupo tratado com EES 100 mg/kg foi de  $73 \pm 12,4$  enquanto para os grupos tratados com morfina e indometacina foram de  $49,8 \pm 30,6$  e  $133,4 \pm 18,3$  respectivamente (Fig. 2B).

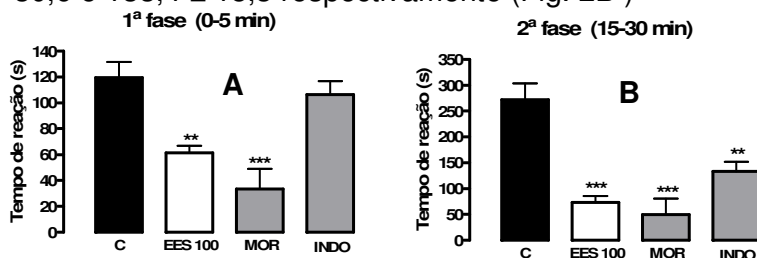


Fig. 2 – Tempo de reatividade (s) no teste de formalina. (A) Primeira fase (dor de origem neurogênica) e (B) Segunda fase (dor de origem inflamatória). Média  $\pm$  EPM. \*\*\*  $P < 0,001$ ; \*\*  $P < 0,01$ .

A pré-administração do antagonista opióide naloxona (3 mg/kg. s.c.) no grupo tratado com veículo não modificou o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético (1,2%, i.p.) em 30 min ( $67,7 \pm 3,0$ ) comparativamente ao grupo pré-administrado com salina ( $70,1 \pm 2,6$ ). O tratamento com o agonista opióide fentanil reduziu o número de contorções para  $6,3 \pm 1,0$ . No entanto, a administração de naloxona 15 min antes da injeção do fentanil, bloqueou o efeito antinociceptivo do agonista opióide nas contorções induzidas pelo ácido acético ( $66,7 \pm 2,2$ ). Resultado semelhante foi evidenciado com o EES 100 mg/kg cujo efeito ( $43,5 \pm 1,7$ ) foi inibido com o tratamento prévio com naloxona ( $68,8 \pm 2,2$ ) (Fig. 3).

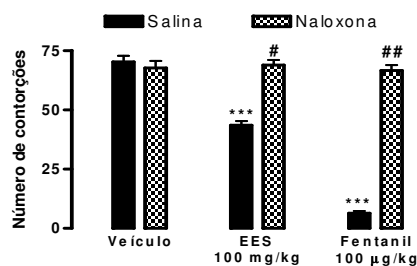


Fig. 3 – Influência do tratamento prévio com o antagonista opióide não seletivo naloxona (3 mg/kg) sobre a atividade antinociceptiva do EES 100 mg/kg e fentanil 100 µg/kg no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. As colunas e barras verticais representam a média ± EPM de 6 animais por grupo experimental. \*\*\* P < 0,001; # Significativamente diferente do grupo tratado com EES e ## do grupo tratado com fentanil (P < 0,001).

Os tempos de latência ao estímulo térmico nociceptivo no tempo zero para o grupo controle foi de  $2,3 \pm 0,4$  s. O tratamento prévio com o EES (25, 50 ou 100 mg/kg) não modificou a reatividade dos animais ao estímulo doloroso durante 2 horas após a administração. Em condições semelhantes, o tratamento com morfina (10 mg/kg) ampliou o tempo de latência ao estímulo térmico em 295 % ( $20,0 \pm 0,0$ ) 30 minutos após a sua administração e continuou causando antinocicepção durante todo o tempo avaliado (Fig. 4).

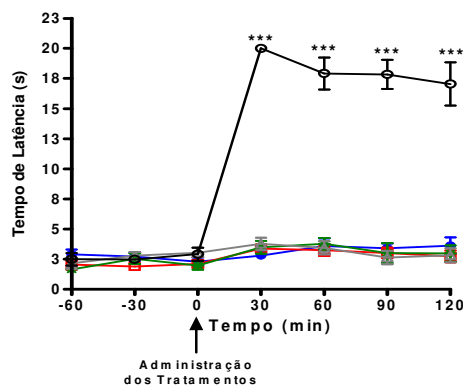


Figura 4 – Efeito do EES ((◻) 25 mg/kg, (★) 50mg/kg e (◄) 100 mg/kg), e morfina (●) 10 mg/kg comparativamente ao grupo controle (●) no teste do *tail flick* avaliado pelo tempo de latência dos camundongos submetidos a dor induzida por calor lesivo na cauda (média ± EPM), para cada grupo de tratamento (n = 6). Os asteriscos denotam o nível de significância em comparação com o grupo controle, \*\*\* P < 0,001.

Este trabalho mostrou que o EES produz significante antinocicepção de acordo com o ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético, um modelo usado para avaliar o potencial de atividade analgésica das drogas. Ele é sensível aos anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais, além de analgésicos narcóticos centrais e periféricos e outras drogas de ação central (SANTOS *et al.*, 1998; REICHERT *et al.*, 2001).

O EES inibiu ambas as fases da dor induzida pela formalina. Opióides de ação central inibem ambas as fases, enquanto a primeira fase pode ser inibida por substâncias que atuam na via cininérgica e a segunda fase pode ser inibida por antiinflamatórios e opióides de ação periférica (OLUYOMI *et al.*, 1992; CORRÊA & CALIXTO, 1993; STEIN, 1993).

Utilizando-se o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético para o estudo do mecanismo da atividade antinociceptiva do EES, foi verificado que o pré-tratamento com naloxona, um antagonista opióide não seletivo, inibiu a atividade antinociceptiva do EES. Estes resultados identificam o envolvimento no sistema opioidérgico do EES.

O teste do *tail flick* mede o tempo de latência do animal a um estímulo térmico. Este ensaio é sensível a drogas opióides tipo morfina (Janssen *et al.*, 1963), cuja atividade analgésica é mediada por receptores  $\mu$ ,  $\kappa$  e  $\delta$  distribuídos no sistema nervoso central (STEIN *et al.*, 1989). O EES não alterou o perfil de resposta ao estímulo térmico quando comparado ao grupo controle. Isso mostra que o EES não atua em receptores opióides centrais, o que nos faz sugerir que seu alvo de ação são os receptores opióides periféricos.

A primeira fase da formalina foi inibida pelo EES o que indica uma possível ação na via cininérgica, sendo que essa ação ainda deve ser investigada. Além desta, a ação antiinflamatória também deve ser investigada visto que a segunda fase da formalina também é inibida por estes agentes.

## 5. Conclusões

Este estudo mostrou que o extrato etanólico das folhas do *Synadenium umbellatum* apresenta atividade antinociceptiva através da ação em receptores opióides periféricos. A purificação do extrato e a identificação das substâncias responsáveis pelo efeito permitirão a confirmação de tal atividade.

## Referências Bibliográficas

COLLIER, H. O. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br. J. Pharmacol. Chemother.*, v.32, n.2, p.295-310, 1968.

CORREA, C. R.; CALIXTO J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. *Br. J. Pharmacol.*, v.110, n.1, p.193-8, 1993.

D'AMOUR, F. E.; SMITH. J. A method for determining loss of pain sensation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.72, p.74-79, 1941.

HUNSKAAR, S.; FASMERK O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods.*, v.14, n.1, p.69-76, 1985.

JANSSEN, P. A.; NIEMEGERES, C. J.; DONY J. G. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforschung*, v.13, p.502-7, 1963.

OLUYOMI A.O.; HART S.L.; SMITH T.W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylmorphine in the formalin test. *Pain*, v.49, n.3, p.415-8, 1992.

ORTENCIO, B. *Medicina popular do Centro-Oeste*. Brasília: Theasaurus, 1997.

REICHERT, J. A. *et al.* Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. *Pain*, v.89, n.2-3, p.221-7, 2001.

SANTOS, A. R.; VEDANA, E. M.; DE FREITAS A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm. Res.*, v.47, n.7, p.302-7, 1998.

STEIN, C. Peripheral mechanisms of opioid analgesia. *Anesth. Analg.*, v.76, p.182-191, 1993.

STEIN, C.; MILLANT, M. J.; SHIPPENBERG T. S. Peripheral opioids receptors mediating antinociception in inflammation. Evidence for involvement of mu, delta and kappa receptores. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.248, p.1269-1275, 1989.