



EFEITO DE *ARRABIDAEA CHICA* VERLOT NA DOR NEUROPÁTICA PÓS-TRAUMÁTICA EM RATOS

FERNANDO CÉSAR VILHENA MOREIRA LIMA; ABNER DE OLIVEIRA FREIRE ;
ALBERTO JORGE OLIVEIRA LOPES; CLEYDLENNE COSTA VASCONCELOS;
MARCUS VINÍCIUS VIÉGAS LIMA; SILVIA TEREZA DE JESUS RODRIGUES
MOREIRA LIMA; MARIA DO SOCORRO DE SOUSA CARTÁGENES

RESUMO

O uso de plantas medicinais faz parte da evolução humana e tem um papel importante no tratamento de inúmeras doenças. A dor neuropática é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial, que acomete cerca de 8% da população mundial, sendo seu manejo considerado um grande desafio. Na busca de novas terapias surge neste cenário a *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, (*A. chica*) conhecida popularmente por carajuru e pariri. Objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia das frações do extrato etanólico de *A. chica*, em modelo experimental de dor neuropática induzida por compressão do tronco principal do nervo ciático em ratos Wistar. Após a obtenção do extrato, foi realizado o fracionamento para aquisição das frações: hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica. Os estudos *in vivo*, foram realizados através dos testes de Von Frey, Rotarod e Weight Bering. Os animais foram tratados durante 15 dias com as frações de *A. chica* na dose 1 mg/Kg/dia. No grupo controle positivo foi utilizado a gabapentina (1 mg/Kg v.o). O estudo farmacológico atenuou significativamente as manifestações comportamentais de dor neuropática nos animais tratados com as frações do extrato etanólico de *A. chica* na dose 1 mg/Kg por via oral em comparação com o grupo salina (0,1 ml/Kg) comprovando a ação antinociceptiva e antioxidante da *A. chica*. Em conclusão, os resultados deste estudo sugerem que o extrato das frações de *A. chica* apresentam potencial terapêutico para o tratamento de dores neuropáticas e/ou adjuvantes no tratamento convencional das mesmas.

Palavras-chave: Plantas medicinais; Somatossensorial; Antinociceptiva; Antioxidante; Potencial terapêutico.

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde, estima que 80% da população mundial faz uso de plantas medicinais como recurso terapêutico (CARNEIRO *et al.*, 2014). A biodiversidade brasileira está entre as maiores do mundo compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores. Dentre essas espécies, destacamos *Arrabidaea chica*, amplamente utilizada na medicina tradicional como planta medicinal. (CORRÊA, 1984; LORENZI; MATOS, 2002).

A dor neuropática é uma categoria clínica causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial e atinge até 8% da população mundial. É uma patologia debilitante que afeta a qualidade de vida, a saúde física e mental dos pacientes e representa um grande desafio no seu manejo clínico (SCHMADER, 2002; GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

Considerando ainda o grande impacto socioeconômico decorrente da dor neuropática, é essencial o desenvolvimento de novos antinociceptivos seguros com efeitos colaterais reduzidos, para o emprego de terapias eficazes, com menos efeitos adversos e que

proporcionam uma maior adesão ao tratamento pelos pacientes. Nessa perspectiva, a espécie vegetal *A. chica* Verlot, aparece como uma fonte promissora nas pesquisas de substâncias ativas com potencial que possam garantir uma terapia eficaz e segura para tratamento da dor neuropática.

Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da atividade antinociceptiva das frações de *A. chica* Verlot, em modelo experimental de dor neuropática em ratos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

Para obtenção do extrato etanólico, foram utilizados 156 g de pó obtidos pela trituração das folhas. O pó foi submetido ao processo de extração por maceração. A solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob vácuo (40 °C), obtendo-se o extrato etanólico. O extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* foi dissolvido em 100 ml da mistura metanol/água (70:30, v/v) por meio de agitação e submetido à partição líquido-líquido usando hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções extrativas foram filtradas (Na₂SO₄ anidro) e concentradas em evaporador rotativo sob vácuo obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FBU).

O estudo é um ensaio pré-clínico experimental, com distribuição aleatória dos grupos de animais, sendo alocados 40 ratos da linhagem *Wistar*, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos e fêmeas pesando em média 225 g ($\pm$ 20). Os animais foram divididos em três grupos assim distribuídos: O grupo controle (n = 05) com animais que não sofreram nenhum tipo de intervenção cirúrgica; o grupo SHAM (n = 05) onde foi realizada a incisão até a visualização do nervo ciático, porém o nervo não foi comprimido; O grupo cirúrgico (n = 30) os animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum. Este grupo, foi dividido em seis subgrupos cada um com cinco animais, denominados de: FH, FC, FAE, FBU, grupo salina e o controle positivo gabapentina. Os subgrupos FH, FC, FAE e FBU foram tratados por via oral com as diferentes frações do extrato na dose 1 mg/Kg, o grupo controle positivo recebeu gabapentina (1 mg/Kg v.o) e o grupo salina Na Cl 0,9% (0,1 ml/Kg). Os animais foram tratados no primeiro dia (D1) após a indução até o décimo quinto dia (D15). Em seguida os animais foram eutanasiados para coleta do sangue, para o estudo bioquímico.

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 2,5% e cloridrato de xilazina 1,75%. Após a tricotomia, foi feita uma incisão coxa direita do animal, expondo assim o nervo ciático. Em seguida efetuou a compressão no tronco comum do ciático da pata direita com uma força média de 0,44 Kgf, através de aparato desenvolvido no nosso laboratório. (Patente – BR 10 2017 000325 6). Finalizando este procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível e desinfetado com solução de rifamicina.

Após a indução da dor neuropática os animais foram avaliados pelos Testes: Rotarod que tem como objetivo avaliar o padrão de deambulação dos animais. O uso da pata lesada foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1, em que: 5 = uso normal do membro; 4 = claudicação leve; 3 = claudicação grave; 2 = intermitente desuso da pata afetada; 1 = completo desuso da pata afetada (KALFF *et al.*, 2010). O teste *Von Frey* com o objetivo avaliar o aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inofensivos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia) a sensibilidade tecidual provocada pela lesão. O limiar nociceptivo de retirada da pata foi definido como o percentual de força para provocar uma suspensão ativa na pata ipsilateral afetada; O teste do Weight bearing os animais são colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repousasse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No primeiro dia após indução da DN, foi detectado pelo teste de *Von Frey* que houve aumento no limiar nociceptivo da pata ipsilateral dos animais, indicando alodinia mecânica entre os grupos estudados: salina (16,13%); SHAM (6,91%), gabapentina (16,13%) e as frações: FH (15,42%), FC (7,91%), FAE (31,28%) e FB (15,42%), quando comparado ao grupo controle. Os animais tratados com as FC e FAE apresentaram melhora significativa na alodinia mecânica, do primeiro (D1) ao décimo quinto dia (D15) do tratamento. A FC no D5 reduziu em 37,71% o limiar nociceptivo ($p = 0,002$), no D10 reduziu em 45,88% ($p < 0,0001$) e no D15 em 49,53% ($p < 0,0001$). A FAE reduziu o limiar nociceptivo em 42,40% no D10 ($p = 0,0018$) e em 46,96% no D15 ($p < 0,0001$), quando comparada ao grupo salina.

Ressaltando que a FC e a FAE apresentaram intensidade de efeito semelhante à gabapentina, que apresentou diminuição da alodinia no décimo e décimo quinto dia após a indução de 50,55% e 57,23%, respectivamente.

O comprometimento da marcha no primeiro dia após a indução da DN, foi avaliada pelo *Teste Rotarod* onde observa-se a redução do escore da marcha nos grupos tratados com as frações do EEAC (FH, FC, FAE e FBU), gabapentina e salina que apresentaram escore 3, que indica claudicação grave ($p < 0,0001$) e o grupo SHAM, escore 4, indicando claudicação leve ($p = 0,0049$), quando comparados ao grupo controle (escore 5 = normal). Os animais tratados com a FC e FAE apresentaram melhoras no escore da marcha do quinto ao décimo quinto de 26% e 20% respectivamente (escore = 4, $p = 0,0314$) quando comparado com o grupo salina (escore = 3). No D15 os animais tratados com a FH apresentaram melhora de 33,33% na marcha (escore = 4), assim como os tratados com a FAE que mostraram o mesmo comportamento dos animais controles positivos tratados com a gabapentina de 26,6% (escore = 3,8) quando comparado com o grupo salina (escore = 3).

Para avaliar a descarga de peso foi considerada pelo *Teste Weigh-bearing* a diferença dos valores da descarga de peso nas patas traseiras dos animais, isto é, a diferença entre a pata ipsilateral e contralateral a lesão. Os valores são expressos em (%) e os valores maiores nas patas contralateral indica *déficit* de sustentação de peso na pata ipsilateral indicando hiperalgesia na pata lesada. Observa-se que no primeiro dia após indução da DN, houve redução no limiar nociceptivo na pata ipsilateral entre os grupos: salina (51,31%), sham (14,79%), FC (22,45%), FBU (17,87%), FAE (58,03), FH(43,57%) e o grupo controle gabapentina (65,06%), quando comparados ao grupo controle. Os animais tratados com FC, FBU e FAE apresentaram melhora significativa do D5 ao D15, quando comparados ao grupo salina, no D15 a FC induziu um aumento de 73,66%, FBU aumentou em 43,15% o limiar nociceptivo. (FC no D5 com $p = 0,0146$, D10 com $p = 0,0239$ e D15 $p < 0,0001$, a FBU no D5 com $p < 0,0001$, D10 com $p < 0,0001$ e D15 com $p = 0,013$), no D15 a gabapentina ($p = 0,0003$) e FAE ($p = 0,0210$) mostraram aumento de 32,64% e 41,39%, respectivamente quando comparada com o grupo salina.

As frações obtidas a partir do EEAC foram avaliadas no teste de *von Frey*. O tratamento dos animais com a FC e FAE (1 mg/Kg) reduziu, a alodinia mecânica na pata ipsilateral dos animais. As frações (FC e FAE) apresentaram a intensidade de efeito semelhante à gabapentina (1 mg/kg), fármaco utilizado como controle positivo nos experimentos e que também apresentou ação analgésica, quando comparado ao grupo salina.

Alguns flavonoides extraídos de plantas são conhecidos como agonistas parciais de GABA e moduladores da ação de benzodiazepínicos (MARDER *et al.*, 2001). Isto é relevante para os resultados desse trabalho visto que as frações do EEAC como a FH, FC e FAE apresentaram maiores concentrações de flavonoides em sua composição conforme Ribeiro, 2012.

Para o teste de atividade locomotora, os animais tratados com as frações hexânica,

clorofórmica e acetato de etila apresentaram melhoras significantes no escore da marcha avaliada pelo Rotarod quando comparados ao grupo salina. O grupo tratado com a gabapentina, na mesma dose utilizada para as frações apresentou efeito semelhante ao dos animais tratados com as referidas frações. Vale ressaltar que estas frações foram as que apresentaram maior teor de polifenólicos totais e flavonoides, substâncias ativas que devem ser responsáveis pelos efeitos farmacológicos de *A. chica*.

Outro teste realizado foi a avaliação da hiperalgesia na pata lesada pelo método de descarga de peso (*Weight bearing*), que mostrou que os animais tratados com as frações: FC, FH, FAC e FBU apresentaram melhora no limiar nociceptivo, quando comparados com o grupo salina. Assim como esperado, o grupo tratado com a gabapentina apresentou ação analgésica, sendo este efeito semelhante ao observado nos grupos tratados com as frações.

Corroborando com os resultados da pesquisa, no estudo de Zorn e colaboradores, 2001, sugerem que esses efeitos podem estar relacionados com a atividade anti-inflamatória do EEAC, quando observou que o extrato de *A. chica* inibiu o fator de transcrição nuclear kappa B, evitando com isso a formação de citocinas e enzimas inflamatórias como iNOS, COX-2, 5-LOX e fosfolipase A2 citosólica. A dor está intimamente relacionada com o processo inflamatório já que os mediadores inflamatórios liberados com a lesão tecidual modificam a transmissão e a excitabilidade dos nociceptores de tal maneira que estímulos previamente leves ou ineficazes se tornam dolorosos (VERRY *et al.*, 2006).

Estudos realizados por Michel e colaboradores em 2015, mostraram a ação do extrato etanólico de *A. chica* como agente anti-inflamatório e atribuíram esta atividade aos flavonoides, luteolina e canferol presentes no extrato. Oliveira *et al.* (2012), estudaram os efeitos do extrato aquoso de *A. chica* sobre o edema induzido por venenos das serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, em camundongos albinos pelas vias oral, intraperitoneal e subcutânea. Os resultados indicaram que o extrato contém substâncias químicas com atividade anti-inflamatória. Nesse estudo, identificou-se compostos como antocianidinas, flavonoides e triterpenos nas frações ativas do EECA e que provavelmente são as substâncias ativas envolvidas na ação antinociceptiva do extrato e frações de *A. chica*. Nas frações FH e FAE foram identificados flavonoides, do tipo flavona (carajuflavona, rutina, apigenina e miricetina), antocianidinas, que são substâncias antioxidantes.

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que as frações do extrato etanólico de *Arrabidaea chica* (EEAC) (1 mg/Kg) apresentam atividade antinociceptiva na dor neuropática induzida pela compressão do nervo ciático em ratos, quando administrados por via oral, durante 15 dias de tratamento.

Diante do exposto os resultados comprovam a ação antinociceptiva das frações do EEAC na dor neuropática, porém, outras investigações farmacológicas são necessárias para se sugerir o(s) mecanismo(s) da ação antinociceptiva e novas investigações moleculares e celulares são necessárias para demonstrar os efeitos centrais ou periféricos possíveis nesta condição crônica debilitante.

REFERÊNCIAS

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P. da; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L.C.; COSTA, J. D.P. Trends of studies for medicinal plants in Brazil, **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais** – UEG/Campus de Iporá, v.3, n. 2, p.44-75 – 2014.

CORRÊA, M.P., Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas. V2. Rio de

Janeiro: Ministério da Agricultura. 1931

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. Mayo Clin Proc., v. 90, n.4, p.532-545. 2015.

KALFF K.M., MOUEDDEN M. E.L., VAN EGMOND J., VEENING, J., JOOSTEN, L., SCHEFFER, G.J., MEERT, T., VISSERS, K. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **Eur J Pharmacol.** 641:108-113, 2010.

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

MARDER M, ESTIU G, BLANCH LB, VIOLA H, WASOWSKI C, MEDINA JH, et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABAA receptor complex. **Bioorg Med Chem** 2001; 9:323– 35.

MICHEL, A. F. R. M.; MELO, M. M.; CAMPOS, P. P.; OLIVEIRA, M. S.; OLIVEIRA, F. A. S.; CASSALI, G. D.; FERRAZ, V. P.; COTA, B. B.; ANDRADE, S. P.; SOUZA, F., E. M. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. Journal of Ethnopharmacology, n. 165, p. 2938, 2015.

OLIVEIRA, D. P. C.; BORRÁS, M. R. L.; FERREIRA, L. C. L.; LÓPEZ- RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 364-373. 2012.

RIBEIRO, ANA FLÁVIA DE CARVALHO. Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot / Ana Flávia de Carvalho Ribeiro. – 2012.

SCHMADER, K. E., Epidemiology and impact on quality of life of post herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. **Clin J Pain.** 2002; 18 (6): 350-354.

VERY JR., W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006

ZORN, B.; A. J.GARCIA-PINERES, V. CASTRO, R. MURILLO, G. MORA.; I. MERFORT. 3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. *Phytochemistry* 2001, 56 : 831 – 835.