

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA – FAMEV
GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA

NATÁLIA MONÇÃO DA COSTA MENDES

ESTUDO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO AQUOSO DE *Campomanesia xanthocarpa* EM MODELO
EXPERIMENTAL *in vivo*

UBERLÂNDIA
NOVEMBRO/ 2018

NATÁLIA MONÇÃO DA COSTA MENDES

**ESTUDO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO AQUOSO DE *Campomanesia xanthocarpa* EM MODELO
EXPERIMENTAL *in vivo***

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário.

Orientadora: Prof. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves

**UBERLÂNDIA
NOVEMBRO / 2018**

NATÁLIA MONÇÃO DA COSTA MENDES

**ESTUDO DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA ANTI-INFLAMATÓRIA DO
EXTRATO AQUOSO DE *Campomanesia xanthocarpa* EM MODELO
EXPERIMENTAL in vivo**

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário.

Banca Examinadora:

Prof. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves
Orientadora

Prof. Dra. Karen Renata Nakamura Hiraki
Membro

Prof. Dra. Celina Monteiro da Cruz Lotufo
Membro

Uberlândia, 21 de novembro de 2018

RESUMO

Campomanesia xanthocarpa é uma frutífera encontrada no Cerrado brasileiro, conhecida como guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda e guabirobeira-do-mato e utilizada na medicina popular para tratamento de processos inflamatórios. Análises fitoquímicas demonstraram que as folhas dessa espécie contêm flavonoides, taninos, saponinas e óleo essencial. Os flavonóides apresentam ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras comprovadas cientificamente. Diante do exposto, este plano de trabalho baseou-se na utilização de um modelo experimental *in vivo* para avaliar as propriedades farmacológicas anti-inflamatórias do extrato aquoso das folhas da planta *C. xanthocarpa*. Para avaliar os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios desta espécie, primeiramente foram coletadas folhas dessa espécie e preparado o extrato aquoso. Posteriormente, foi realizada a (i) a padronização da concentração de carragenina utilizada para indução do edema de pata; (ii) o tempo necessário para análise do edema de pata, após a administração intraplantar da carragenina; (iii) padronização dos cortes histológicos para análise histopatológica. Os dados obtidos mostraram que o extrato aquoso da *C. xanthocarpa* não apresentou atividade antiedematogênica no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos BALB/c.

Palavras-chave: *C. xanthocarpa*, anti-inflamatório, flavonoides.

ABSTRACT

Campomanesia xanthocarpa is a fruit found in the Brazilian Cerrado, known as guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda and guabirobeira-do-mato, and used in popular medicine to treat inflammatory processes. Phytochemical analyzes have shown that the leaves of this species contain flavonoids, tannins, saponins and essential oil. Flavonoids present scientifically proven anti-inflammatory and immunomodulatory actions. In view of the above, this work plan is based on the use of an *in vivo* experimental model to evaluate the anti-inflammatory pharmacological properties of the aqueous extract of the leaves of the *C. xanthocarpa* plant. In order to evaluate the pharmacological anti-inflammatory effects of this species, the leaves were first collected from this species and the aqueous extract prepared. Subsequently, was performed a (i) standardization of the strategy of use of foot edema was performed; (ii) the time required for paw edema analysis after intraplantar administration of carrageenan; (iii) standardization of histological sections for histopathological analysis. The data obtained showed that the aqueous extract of *C. xanthocarpa* did not present antiedematogenic activity in the model of paw edema induced by carrageenan in BALB/c mice.

Key words: C. xanthocarpa, anti-inflammatory, flavonoids.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA: Ácido araquidônico

AAS: Ácido acetilsalicílico

ADP: Adenosina difosfato

ANOVA: Análise de variância

CBEA: Centro de Bioterismo e Experimentação Animal

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

CGN: Carragenina

ELISA: Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay

IFN- γ : Interferon gama

IL-10: Interleucina 10

iNOS: Óxido nítrico sintase induzível

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeo

NO: Óxido nítrico

PCR-AS: Proteína C reativa de alta sensibilidade

PGE2: Prostaglandina E2

TNF- α : Fator de necrose tumoral - alfa

TTPa: Tromboplastina parcial ativada

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Folhas da planta <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	16
Figura 2 - Administração das soluções por meio de cânula de gavagem.....	17
Figura 3 - Aparelho pletismômetro utilizado para determinação do volume das patas.....	19
Figura 4. Esquematização dos tratamentos recebidos pelos animais na padronização do método para avaliação do edema de pata induzido por carragenina.....	20
Figura 5. Esquematização dos tratamentos recebidos pelos animais na avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>C. xanthocarpa</i> nos grupos de animais testados através do edema de pata induzido por carragenina.....	22
Figura 6 - Edema de pata induzido por carragenina.....	27
Figura 7 - Padronização do método de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c.....	28
Figura 8 - Avaliação do efeito antiedematogênico do anti-inflamatório indometacina em modelo de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c....	29
Figura 9 - Avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	30
Figura 10 - A e B: cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%. (A) aumento de 4x; (B) aumento de 10x.....	32
Figura 11 - C e D: cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%. (C) aumento de 40x; (D) aumento de 100x.....	32
Figura 12 - Dosagem de mieloperoxidase (MPO) (D.O./g peso úmido) em amostras teciduais de animais tratados por via oral com carboximetilcelulose (0,5%; grupo controle negativo - CTneg); indometacina (10 mg/kg; grupo controle positivo CTpos); extrato aquoso da <i>Campomanesia xanthocarpa</i> (concentrações 100, 550 e 1000 mg/kg), e, após 60 minutos, tratados com injeção intraplantar de carragenina 1,0%.....	33

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	8
2. REVISÃO DE LITERATURA	9
2.1 <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	9
2.2 Flavonoides e taninos.....	11
3. JUSTIFICATIVA	13
4. OBJETIVOS	14
4.1 Objetivo geral.....	14
4.2 Objetivos específicos	14
5. MATERIAL E MÉTODOS	15
5.1 Condição ambiental	15
5.2 Material vegetal.....	15
5.3 Obtenção do extrato aquoso	16
5.4 Animais.....	16
5.5 Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios.....	17
5.5.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	17
5.5.1.1 Padronização do método para avaliação do edema de pata induzido por carragenina.....	17
5.5.1.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>C. xanthocarpa</i> nos grupos de animais testados através do edema de pata induzido por carragenina.....	20
5.6 Protocolo de eutanásia	22
5.7 Padronização dos cortes histológicos para análise histopatológica.....	22
5.8 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	24
5.9 Análise estatística	24
6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	26
7. RESULTADOS.....	27
7.1 Padronização de modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória em camundongos BALB/c: edema de pata induzido por carragenina.....	27
7.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso da <i>Campomanesia xanthocarpa</i>	28
7.3 Padronização das preparações de tecido plantar (músculo plantar) para análise histopatológica.....	31
7.4 Análise histopatológica da padronização dos cortes histológicos.....	32
7.5 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)	32
8. DISCUSSÃO.....	34
9. CONCLUSÕES.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
ANEXO	42

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais como estratégia para tratamento de diferentes condições patológicas é bastante antigo, por exemplo, o uso da papoula (*Papaver somnifer*) e da maconha (*Cannabis sativa*) foi descrito há, aproximadamente, 4.000 anos atrás. Documentos arqueológicos, atualmente à disposição, registram os fatos a partir do ano 3.000 a.C. e possibilitam afirmar que muitos povos, há milênios de anos, tinham conhecimento do valor de inúmeras plantas, seja pelas suas qualidades curativas, seja por permitirem sensações anormais, como, por exemplo, distorções do tempo, perda da memória recente, diminuição da atenção e concentração, delírios persecutórios e até mesmo despersonalização (BARRONA, 2017).

No Brasil, a utilização de ervas medicinais tem na prática indígena sua origem que, influenciada pela cultura africana e portuguesa, gerou uma vasta cultura popular. Na busca do alívio para suas dores e enfermidades, o homem foi impelido, através dos séculos, a analisar os fenômenos da natureza e a buscar soluções que o ajudassem a minorar seus sofrimentos e o consumo de plantas medicinais teria sido a primeira forma de uso de medicamento de que se tem notícia. Muitas descobertas foram feitas pela necessidade de se obter novas fontes de alimentos, mas, provavelmente, um número expressivo deveu-se à curiosidade humana.

Atualmente, as plantas medicinais ainda representam uma opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente para populações de baixa renda. Pesquisas científicas e identificação de propriedades farmacológicas de diversas espécies vegetais contribuem fortemente para validar, ou não, o uso popular dessas plantas e colaboram para a descoberta de novas drogas de origem vegetal com potencial uso terapêutico na medicina humana, bem como na medicina veterinária.

A *Campomanesia xanthocarpa* é uma frutífera nativa do Cerrado brasileiro, pertencente à família Myrtaceae. Dados da literatura mostram que derivados vegetais dessa espécie possuem potencial uso terapêutico em diferentes condições patológicas e suas propriedades farmacológicas têm sido atribuídas à presença de substâncias polifenóis, flavonoides e taninos (MARKMAN et al., 2002). Os flavonóides apresentam ações anti-inflamatórias e imunomoduladoras (COUTINHO et al., 2009), contudo, até o presente momento, foram investigadas possíveis ações anti-inflamatórias do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* apenas em modelos experimentais de hipercolesterolemia (VIECILI et al., 2014). Assim, o objetivo geral deste estudo foi avaliar possíveis efeitos farmacológicos anti-inflamatórios do extrato aquoso obtido das folhas da *Campomanesia xanthocarpa* em modelo experimental *in vivo*, associado a doenças inflamatórias agudas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 *Campomanesia xanthocarpa*

Campomanesia xanthocarpa é uma frutífera lenhosa da família Myrtaceae (BARROSO, 1991). Popularmente, é conhecida como guabirobeira, guavirova, guabiroba-miúda e guabirobeira-do-mato. Entretanto, todas têm como sinônimos botânicos *C. crenata*, *C. dusenii*, *C. littoralis*, *C. malifolia* e *C. rhombea* (VALLILO et al., 2008). A frutífera pode ser encontrada desde o estado de Minas Gerais até o Rio Grande do Sul (GOGOSZ et al., 2010). Na natureza, é identificada como arbusto, arvoreta ou árvore e tem como características os seguintes aspectos: apresenta-se com 10 a 20 m de altura e possui até 60 cm de diâmetro. Os frutos, de potencial econômico relevante, são redondos e variam entre verdes e amarelos de acordo com sua maturação (VALLILO et al., 2008). Existem relatos do seu uso popular em doenças inflamatórias, renais, digestivas e dislipidemia (SANT' ANNA et al., 2017).

Vários estudos investigam o potencial uso terapêutico de derivados vegetais de espécies do gênero *Campomanesia*.

Um estudo com acetato de etila e extrato aquoso de folhas da *Campomanesia adamantium* foi realizado para demonstrar atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias em um modelo *in vivo*, utilizando ratos suíços. Ao avaliar os efeitos do acetato de etila e do extrato aquoso, notou-se inibição do edema de pata induzido por carragenina. Em placas de cultura, acetato de etila e os flavonoides miricitrina e miricetina, isolados da *Campomanesia adamantium*, foram avaliados quanto à capacidade de modular a produção de óxido nítrico (NO), quantificado por meio da reação de Griess, TNF- α (fator de necrose tumoral alfa) e IL-10 (interleucina 10), quantificados por ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay), em macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ (Lipopolissacarídeo/Interferon gama). Os resultados apresentaram uma redução significativa na produção de TNF- α , uma citocina pró-inflamatória que induz formação de PGE2 (prostaglandina E2), e, finalmente, o aumento de IL-10, citocina que tem efeito inibidor sobre TNF- α e produção de PGE2, o que demonstra potencial anti-inflamatório para esse gênero. (FERREIRA et al., 2013).

Estudos utilizando a espécie *C. xanthocarpa* avaliaram efeitos sobre dislipidemias, obesidade e hemostasia. Os níveis totais de colesterol e de LDL (lipoproteína de baixa densidade) diminuíram em indivíduos hipercolesterolêmicos que receberam 500 mg do extrato aquoso de *C. xanthocarpa*. Constatou-se também redução de estresse oxidativo e de componentes do processo inflamatório (proteína C reativa de alta sensibilidade - PCR-AS) e

um aumento significativo de NO em indivíduos hipercolesterolêmicos que receberam 1000 mg do extrato aquoso de *C. xanthocarpa*, quando comparados ao grupo controle (VIECILI et al., 2014). Além desse estudo, Klafke e colaboradores (2010) investigaram em modelo experimental *in vivo* alterações nos níveis sanguíneos de colesterol induzidas por de *C. xanthocarpa* trituradas, armazenadas em cápsulas e administradas por via oral. Após o experimento, observaram diminuição nos níveis de colesterol e LDL em indivíduos hipercolesterolêmicos que receberam 500mg da planta em relação ao grupo controle e uma redução significativa no estresse oxidativo nos pacientes com hipercolesterolemia que receberam 250mg e 500mg da planta quando comparados aos níveis anteriores ao tratamento. Também foi demonstrado que ratos obesos expostos a um tratamento crônico com o extrato aquoso de folhas de *C. xanthocarpa* apresentaram uma diminuição expressiva de massa corporal e glicemia (BIAVATTI et al., 2004).

Em estudos posteriores, Klafke e colaboradores (2012) avaliaram as atividades antitrombótica e fibrinolítica em camundongos Swiss machos tratados oralmente durante 5 dias com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* ou ácido acetilsalicílico (AAS), e, ao final do tratamento, os animais foram desafiados quanto a hemorragias, tromboembolismo agudo e atividade ulcerogênica. Também foi avaliado o tempo de protrombina e o tempo de tromboplastina parcial ativada (TTPa) após a administração oral. Em ensaios *in vitro*, os efeitos antiplaquetários do extrato foram avaliados na agregação plaquetária e a atividade fibrinolítica foi observada por degradação de coágulos sanguíneos artificiais humanos ou de camundongos. Os resultados mostraram que o extrato inibiu a agregação plaquetária sem demonstrar citotoxicidade em plaquetas, apresentou atividade fibrinolítica, prolongou ligeiramente o TTPa e não mostrou atividade ulcerogênica, demonstrando que a *C. xanthocarpa* tem um efeito protetor significativo na trombose.

Mais tarde, constatou-se também atividade anti-inflamatória por meio da avaliação de marcadores pró-inflamatórios, como IL-1, IL-6, TNF- α e INF- γ , e de marcadores anti-inflamatórios, como IL-10, em amostras de sangue em camundongos nocautes para o LDLr. Os animais receberam dieta hipercolesterolêmica durante 4 semanas e foram tratados com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* (100 mg / kg), durante 5 dias, tendo como resultado o aumento de fatores anti-inflamatórios e redução de fatores pró-inflamatórios, com resultados melhores que os obtidos com o uso de AAS (100 mg / kg). Além disso, o extrato analisado não induziu atividade ulcerogênica, enquanto o AAS induziu a formação de lesões na mucosa gástrica (KLAFKE et al., 2016). Otero e colaboradores também identificaram ação antiplaquetária,

determinada por método turbidimétrico, utilizando-se folhas de *C. xanthocarpa* trituradas e acondicionadas em cápsulas.

No trato gastrointestinal, estudo demonstrou prevenção da ulceração gástrica e ausência de toxicidade em ratos tratados oralmente com extrato hidroetanólico (400 mg/kg) em doses de até 5 g/kg (MARKMAN et al., 2004).

Também foram investigados efeitos da *C. xanthocarpa* em funções reprodutoras. Auharek et al. (2013) avaliaram o efeito do extrato aquoso de *C. xanthocarpa*, administrado por via oral, em ratas grávidas e observaram que a função reprodutiva não foi alterada e não houve interrupção do progresso do desenvolvimento embriofetal. Além disso, atribuíram a essa espécie um possível uso terapêutico, uma vez que reduziu locais de reabsorção, aumentou o peso placentário e o número de fetos vivos. Já os estudos de Pastori et al. (2013) demonstraram atividades genotóxicas e antiproliferativas em infusões de extrato aquoso e óleo essencial de *C. xanthocarpa* utilizando o teste in vivo da cebola (*Allium cepa*), mas que, de acordo com os resultados obtidos, os extratos desta planta devem ser estudados em modelos animais para verificar seu uso seguro.

Atividades antimicrobianas também foram observadas com a espécie *C. xanthocarpa*. Óleos essenciais de *C. xanthocarpa* mostraram atividade antifúngica em cepas de *Candida* (CAVALCANTI et al., 2012).

No sistema cardiovascular, Sant'anna et al. (2017) verificaram que a administração do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* tem efeito hipotensivo dose-dependente em ratos normotensos, sugerindo seu uso como agente anti-hipertensivo.

Compostos químicos isolados e o extrato hidroetanólico de folhas da *C. xanthocarpa*, em uma única administração, inibiram o edema de pata induzido por carragenina e reduziram a migração de leucócitos e o extravasamento de proteínas para a cavidade pleural em modelo de pleurite (DA SILVA et al., 2016).

Diante do exposto, a despeito dos vários trabalhos da literatura acerca de possíveis ações farmacológicas da espécie *C. xanthocarpa*, até o presente momento, ainda não há descrição de efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso da referida espécie.

2.2 Flavonoides e taninos

Frente a uma infecção ou a uma lesão tecidual, presentes em diversas patologias, o organismo responde elaborando uma reação inflamatória. Esta compreende dois tipos de respostas: uma inespecífica (resposta inata), responsável pela vermelhidão, edema, calor, dor e

perda de função da região acometida; e outra específica, com produção de anticorpos específicos contra o agente agressor. Atualmente, a abordagem terapêutica mais utilizada para essas reações é a utilização de anti-inflamatórios, o que estimula a busca de novas moléculas bioativas que apresentem ação eficaz no tratamento da inflamação (COUTINHO et al., 2009).

Dentre os diversos produtos bioativos, amplamente distribuídos pela flora brasileira, estão os flavonoides, que consistem em substâncias polifenólicas relevantes por suas diversas ações biológicas, e, dentre elas, sua atividade antitumoral, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória. Quanto à sua atividade anti-inflamatória, os flavonoides inibem a proliferação de linfócitos T, assim como a produção de citocinas pró- inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulam a atividade de enzimas da via metabólica do AA (como a fosfolipase A2, ciclooxigenase e lipooxigenase) e a ação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) (CAZAROLLI et al., 2008).

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. Possuem habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas e alcaloides e são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais devido à precipitação de glicoproteínas salivares, o que ocasiona a perda do poder lubrificante. Provavelmente, a ligação entre taninos e proteínas ocorre por meio de pontes de hidrogênio entre os grupos fenólicos dos taninos e sítios específicos nas proteínas. A utilização de drogas derivadas de espécies vegetais ricas em taninos relaciona-se, principalmente, à propriedade adstringente dessas substâncias, a qual produz efeito antidiarreico e antisséptico; impermeabiliza e protege as camadas mais expostas de pele e mucosas. Além disso, os taninos estão associados a ações antimicrobiana e antifúngica por precipitarem proteínas; atividade anti-HIV devido à inibição da transcriptase reversa; ação hemostática; e, pela precipitação de alcaloides, podem servir como antídoto em casos de intoxicações; os taninos também podem formar uma camada protetora (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre o tecido epitelial, em casos de feridas, queimaduras e inflamação (MONTEIRO et al., 2005).

Na literatura, está bem estabelecido que os compostos bioativos supracitados estão amplamente distribuídos entre diversas espécies vegetais, dentre elas a *Campomanesia xanthocarpa*.

3 JUSTIFICATIVA

Flavonóides e taninos apresentam atividades anti-inflamatórias e muitas espécies vegetais são capazes de produzir esses metabólitos secundários, como, por exemplo, a *Campomanesia xanthocarpa*. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório a partir do extrato aquoso dessa importante espécie do Cerrado brasileiro. Além disso, popularmente, a utilização dessa espécie para afecções inflamatórias é feita por meio da infusão das folhas preparadas, geralmente, em água quente. Diante disso, de forma a mimetizar esse preparo e investigar uma provável ação anti-inflamatória dessa planta, optou-se pela utilização do extrato aquoso no modelo experimental do presente estudo.

Muitas substâncias anti-inflamatórias são capazes de diminuir a produção ou bloquear a ação de mediadores algésicos, tais como prostaglandinas, histamina, serotonina e bradicinina; portanto, não é incomum encontrarmos drogas que possuam ambas as atividades farmacológicas, analgesia e anti-inflamatória. Assim, o presente estudo investigou os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso liofilizado das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* utilizando modelo experimental *in vivo*.

Cabe ressaltar que, este estudo tem potencial para contribuir com o desenvolvimento da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, cujas ações visam, dentre outras: (1) promover pesquisa, desenvolvimento de tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos; (2) o uso sustentável da biodiversidade (entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas são a matéria-prima para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos); (3) incentivar a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovação em plantas medicinais e fitoterápicos; (4) fomentar pesquisa, desenvolvimento tecnológico e inovação com base na biodiversidade brasileira, abrangendo espécies vegetais nativas e exóticas adaptadas, priorizando as necessidades epidemiológicas da população (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2006).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Este projeto de pesquisa tem como objetivo avaliar os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios agudos do extrato aquoso liofilizado das folhas da espécie vegetal *Campomanesia xanthocarpa* utilizando modelo experimental *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

- Preparar extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa*.
- Avaliar efeitos farmacológicos anti-inflamatórios agudos por meio de testes para:
 - Avaliar ação antiedematogênica sobre edema de pata induzido por carragenina;
 - Analisar alterações histopatológicas no músculo plantar;
 - Dosar a enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Condição ambiental

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia Geral, Departamento de Farmacologia, Instituto de Ciências Biomédicas, na Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

5.2 Material vegetal

A espécie *Campomanesia xanthocarpa*, a partir da qual foram coletadas as folhas para a preparação do extrato aquoso, foi previamente identificada por biólogo competente e uma exsicata da espécie foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro HUFU 65525).

Neste estudo, as folhas da *Campomanesia xanthocarpa* foram coletadas em campos de vegetação espontânea em outubro/2018, no Sítio Primavera, Distrito Cruzeiro dos Peixotos, Uberlândia, MG (Coordenadas geográficas: 18°43'46,1'' S; 48°22'07,00'' W; Fonte: Google maps), e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. João Batista, da Faculdade de medicina Veterinária, Universidade Federal de Uberlândia. Posteriormente, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Farmacologia Geral. Algumas características das folhas foram observadas durante a sua seleção: as folhas da *C. xanthocarpa* eram pecioladas, simples (limbo formado por apenas uma lâmina), cartáceas (finas, rígidas e quebradiças), ovaladas (parte mais larga próximo à base), inervadas, glabras (desprovidas de tricomas) e lisas, concolores (uma única cor: verde claro), ainda pequenas (folhas jovens) (**Figura 1**).



Figura 1. *Campomanesia xanthocarpa*.

Origem: Sítio Primavera, Distrito Cruzeiro dos Peixotos, Uberlândia, MG. Coordenadas geográficas: Coordenadas geográficas: 18°43'46,1'' S; 48°22'07,00'' W. **Fonte própria (2018)**

5.3 Obtenção do extrato aquoso

Para a preparação do extrato aquoso, após a coleta, as folhas da *C. xanthocarpa* foram separadas dos galhos, destacaram-se os pecíolos, e foram selecionadas apenas aquelas que, macroscopicamente, não apresentavam indicativos de contaminação por microrganismos. Em seguida, as folhas foram lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador. As folhas trituradas foram colocadas em proveta contendo água destilada na proporção de 10% (m/v). A extração foi realizada à temperatura ambiente, durante 48 horas. Posteriormente, o extrato foi duplamente filtrado, inicialmente em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura - 20° C. Após o congelamento, os extratos foram liofilizados à - 40 °C até a total remoção do conteúdo de água. O material obtido foi pesado e acondicionado em freezer a - 20 °C até a data da utilização (PRADO et al., 2014).

5.4 Animais

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 15 a 30g. Os animais foram fornecidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada (25 ± 2 °C) e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*.

A administração por via oral de fármacos, veículos ou extrato aquoso de *C. xanthocarpa* aos animais foi realizada por meio de cânula de gavagem específica para camundongos, a qual foi introduzida na boca do animal e gentilmente conduzida até o estômago (**Figura 2**). O volume total administrado foi 1,0 mL / 100 g animal.



Figura 2: Gavagem.
Fonte: o autor (2018)

5.5 Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios

5.5.1 Edema de pata induzido por carragenina

5.5.1.1 Padronização do método para avaliação do edema de pata induzido por carragenina

Neste procedimento, foi determinada a concentração ideal de carragenina (CGN; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a fim de melhor observar-se o seu efeito edematogênico de modo tempo-dependente; foram definidos os tempos para avaliação do edema e, por fim, verificada a eficácia do anti-inflamatório indometacina na redução do edema induzido por CGN. As concentrações de CGN avaliadas quanto à indução do edema de pata foram: CGN 1% (10 mg de CGN diluída em 1 ml de solução salina 0,9% estéril) e CGN 0,5% (5 mg CGN diluída em 1 mL de solução salina 0,9% estéril). O edema foi avaliado nos intervalos de tempo 0,25, 0,5, 1, 4 e 6 horas após a injeção intraplantar (intramuscular) de carragenina. Uma hora antes a administração oral, os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico. Os animais foram divididos em quatro grupos experimentais (G1 – G4), com os seguintes tratamentos:

- Grupo 1A (n=3): animais tratados por via oral (v.o.) com solução de carboximetilcelulose (CBX) 0,5% (1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório) + 30 µL de CGN a 1,0% na pata posterior direita 60 minutos após o tratamento por via oral;
- Grupo 1B (n=3): animais tratados por via oral (v.o.) com solução de CBX 0,5% (1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório) + 30 µL de CGN a 0,5% na pata posterior direita 60 minutos após o tratamento por via oral;
- Grupo 2A (n=3): animais tratados por via oral (v.o.) com indometacina preparada em solução de CBX 0,5% (10 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle positivo para efeito anti-inflamatório) + 30 µL de CGN a 1,0% na pata posterior direita 60 minutos após o tratamento por via oral;
- Grupo 2B (n=3): animais tratados por via oral (v.o.) com indometacina preparada em solução de CBX 0,5% (10 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle positivo para efeito anti-inflamatório) + 30 µL de CGN a 0,5% na pata posterior direita 60 minutos após o tratamento por via oral.

Como controle negativo do efeito induzido pela injeção de CGN, foi administrado igual volume (30 µL) de solução salina estéril (NaCl 0,9%) na pata posterior esquerda em todos os grupos experimentais (ALBERTINI et al., 2004; LIMA et al., 2013). O fármaco padrão indometacina e solução de CBX 0,5% foram utilizados como controles positivo (KOSTER et al., 1959) e negativo, respectivamente. As injeções intraplantares foram realizadas utilizando-se seringas para insulina (0,3 mL) e agulhas ultra-finas (BD ultra-fine II, 8 mm de comprimento, 0,3 mm de calibre). O volume das patas, medido até a articulação tíbio-társica, foi determinado antes e após 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas a injeção da CGN, com o auxílio de um pletismômetro, equipamento que registra o volume de solução deslocada em um sistema de vasos

comunicantes, em resposta à introdução da pata de animais experimentais em uma das cubas que compõe o sistema, portanto, é ideal para avaliação do edema que ocorre em processos inflamatórios (**Figura 3**) (VAN ARMAN et al, 1965). O edema foi expresso como o aumento do volume (mL; valores absolutos) da pata tratada com CGN (pata direita) comparado à pata controle negativo (pata esquerda), em cada intervalo de tempo.



Figura 3: Plestismômetro.
Fonte: o autor (2018)

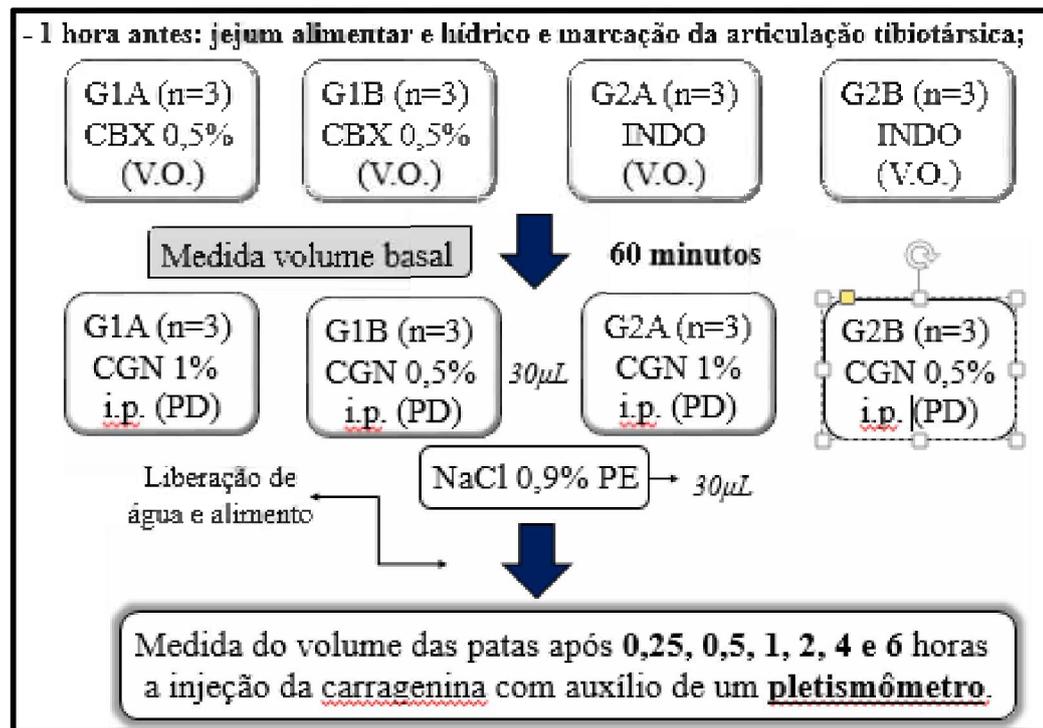


Figura 4. Fluxograma: Padronização do método para avaliação do edema de pata induzido por carragenina (PD: pata direita; PE: pata esquerda; CBX: carboximetilcelulose; CGN: carragenina; INDO: indometacina; G1A-B e G2A-B: grupos experimentais; v.o.: via oral; i.p.: intraplantar).

5.5.1.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* nos grupos de animais testados através do edema de pata induzido por carragenina

A hipernocicepção induzida por injeção intraplantar de carragenina é um modelo utilizado para investigar hiperalgesia inflamatória em camundongos. Assim, utilizando esse modelo de estudo, investigou-se um possível efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *C. xanthocarpa*. Foram realizados dois experimentos independentes, utilizando grupos experimentais com até 4 animais ($n = 4$). Uma hora antes do tratamento oral, os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico. Três concentrações de extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* (100, 550, 1000 mg/Kg) solubilizado em água destilada foram administradas por via oral (v.o.; 1,0 mL/100 g animal). O grupo controle negativo para o efeito anti-inflamatório recebeu CBX 0,5% (v.o., 1,0 mL/100 g animal), enquanto o grupo controle positivo para esse efeito recebeu indometacina solubilizada em CBX 0,5% (10 mg/kg, v.o.). Como os veículos para solubilização do extrato (veículo: água destilada) e da indometacina (veículo: CBX 0,5%) foram diferentes, aqueles animais tratados com indometacina também

receberam igual volume de água (veículo do extrato), enquanto os animais tratados com extrato, receberam igual volume de CBX, e o grupo controle negativo recebeu CBX 0,5% e igual volume de água. De acordo com o tratamento recebido, em cada experimento, os grupos experimentais foram:

- Grupo 1 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com água destilada (1,0 mL/100 g animal) e carboximetilcelulose 0,5% (v.o., 1,0 mL/100 g animal);
- Grupo 2 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com indometacina (10 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e água destilada (v.o., 1,0 mL/100 g animal);
- Grupo 3 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* (100 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e carboximetilcelulose 0,5% (v.o., 1,0 mL/100 g animal);
- Grupo 4 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* (550 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e carboximetilcelulose 0,5% (v.o., 1,0 mL/100 g animal);
- Grupo 5 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com extrato aquoso de *C. xanthocarpa* (1000 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e carboximetilcelulose 0,5% (v.o., 1,0 mL/100 g animal).

A indução do edema de pata foi realizada 60 minutos após os tratamentos por via oral por meio da injeção intraplantar de 30 µL de carragenina (CGN; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 1,0% (10 mg CGN diluída em 1 mL de solução salina 0,9%) na pata posterior direita (30 µL CGN 1,0% correspondem a 300 µg de CGN); como controle negativo do efeito induzido pela injeção de carragenina, na pata contralateral foi administrado igual volume de solução salina estéril (veículo) (ALBERTINI et al., 2004; LIMA et al., 2013). As injeções intraplantares foram realizadas utilizando-se seringas para insulina (0,3 mL) e agulhas ultra-finas (BD ultra-fine II, 8 mm de comprimento, 0,3 mm de calibre). O volume das patas foi determinado antes da injeção da carragenina e após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas a injeção da carragenina, com o auxílio de um pletismômetro (**Figura 3**) (VAN ARMAN et al, 1965). O edema foi expresso como o aumento do volume (mL; valores absolutos) da pata tratada com CGN (pata direita) comparado à pata controle negativo (pata esquerda), em cada intervalo de tempo.

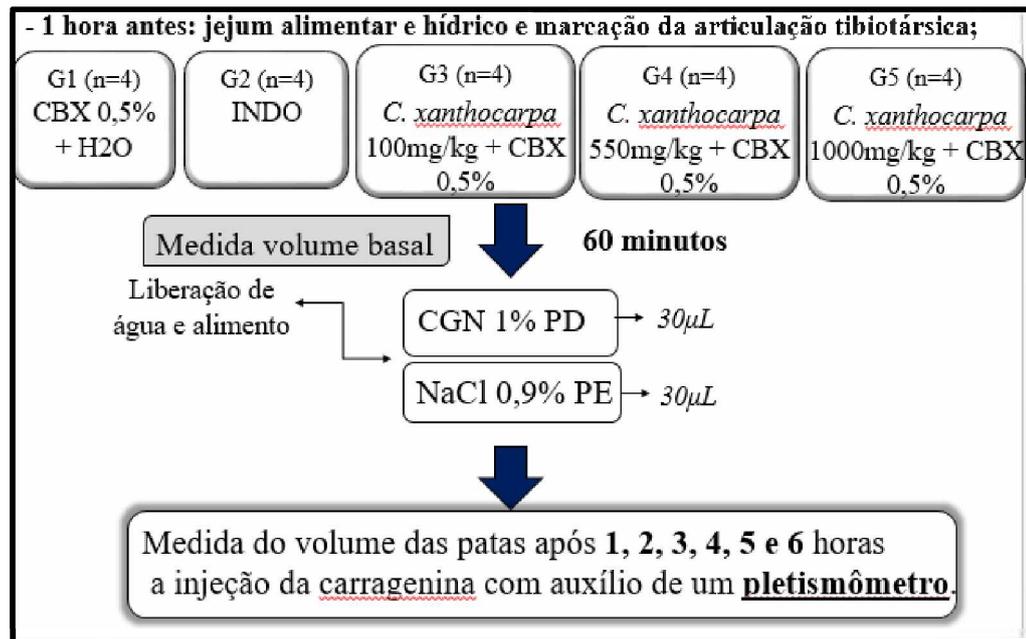


Figura 5. Fluxograma: Avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* nos grupos de animais experimentais. (PD: pata direita; PE: pata esquerda; CBX: carboximetilcelulose; CGN: carragenina; INDO: indometacina; G1-5: grupos experimentais.

5.6 Protocolo de eutanásia

Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical sem anestesia prévia. Este procedimento é aceito pelo Conselho Federal de Medicina Veterinária para pequenos animais, incluindo aves pequenas e roedores com menos de 200 gramas (GUIA BRASILEIRO DE BOAS PRÁTICAS EM EUTANÁSIA EM ANIMAIS, 2012).

5.7 Padronização dos cortes histológicos para análise histopatológica

Após a última medida do edema podal, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. Em seguida, as patas posteriores direita e esquerda foram seccionadas com lâmina de bisturi e colocadas em tubos falcon contendo formalina 10% (formaldeído 37% de pureza diluído em água destilada) e mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 12 horas, para a fixação. Após essa fixação prévia, foram utilizadas para posterior processamento: **(A)** as patas completas (pata com coxim e dedos); **(B)** somente o coxim, obtido a partir de corte nas patas

fixadas; **(C)** somente o coxim em corte longitudinal (dividido em duas partes). Em momento posterior, o coxim completo **(D)** e o coxim em corte longitudinal **(E)** foram submetidos a procedimento para desmineralização com ácido fórmico a 10% durante 48 horas, antes do processamento para obtenção dos cortes histológicos. As amostras **(A – E)** foram processadas para posterior inclusão em parafina e preparação dos cortes histológicos, seguindo-se a sequência: **(1)** as patas foram colocadas em cassetes próprios e identificados; **(2)** desidratação em concentrações crescentes de álcoois **(I)** álcool 70% overnight, e, posteriormente a **(II)** 85%, **(III)** 95%, **(IV)** Absoluto I, **(V)** Absoluto II e, por fim, **(VI)** Absoluto III durante 30 minutos cada, sendo o álcool absoluto correspondente a 99% de pureza; **(3)** para a diafanização, utilizou-se três banhos de Xilol (Xilol 1, Xilol 2 e Xilol 3) também de duração de 30 minutos cada, para permitir melhor penetração de parafina na peça. Em seguida **(4)**, as amostras foram colocadas em recipientes contendo parafina líquida a 60 °C e mantidas em estufa, num total de três banhos de parafina, cada um com duração de 30 minutos. Na inclusão propriamente dita **(5)**, verteu-se a parafina com as amostras com a face plantar voltada para baixo em uma forma metálica para a formação dos blocos e esse material foi mantido por 12 horas à temperatura ambiente. Após a inclusão em parafina, **(6)** os blocos foram utilizados para a obtenção dos cortes histológicos em aparelho denominado micrótomo. Os cortes histológicos foram feitos com espessura de cinco micrômetros (μm) e, imediatamente, foram distendidos em água aquecida em banho-maria a 56°C, em um aparelho aquecedor com termostato, para evitar microdobras nos cortes. Após a distensão, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro, as quais foram colocadas em estufa por duas horas e, em seguida, coradas com hematoxilina/eosina. Para a coloração, os cortes parafinizados e colocados sobre as lâminas de vidro foram: **(1)** desparafinizados em xilol III, II e I durante 15 minutos cada; **(2)** hidratados em álcool (imersão em álcool absoluto III por 1 minuto; imersão em álcool absoluto II por 1 minuto; imersão em álcool absoluto I por 1 minuto; imersão em álcool 95% por 1 minuto; imersão em álcool 85% por 1 minuto; imersão em álcool 70% por 1 minuto); em seguida, as lâminas foram **(3)** lavadas em água corrente durante 10 minutos; **(4)** lavadas em água destilada durante 5 minutos; **(5)** coradas pela hematoxilina de Harris (corante básico) filtrada por 50 segundos; **(6)** lavadas em água corrente durante 10 minutos; **(7)** lavadas em água destilada durante 5 minutos; **(8)** coradas pela Eosina-floxina (corante ácido) por 1,5 minutos a 2 minutos; **(9)** lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante (as lâminas foram mergulhadas 4 vezes em água corrente). Em seguida, os cortes foram **(10)** desidratados em álcool (imersão em álcool 70%; imersão em álcool 85%; imersão em álcool 95%; álcool absoluto I; álcool absoluto II; álcool absoluto III; as lâminas foram mergulhadas 10 vezes em cada reagente); **(11)** diafanizados em xilol I, II e III durante

10 minutos cada; e, por fim, foi feita a (12) montagem das lâminas colocando-se uma gota de resina sintética sobre uma lamínula de vidro (24 mm x 60 mm), e esta é, então, colocada e comprimida sobre o corte de modo a espalhar-se a resina em fina camada entre a lâmina e a lamínula. Após a montagem, (13) as lâminas foram colocadas em estufa para secagem a 37 °C por 48 horas (a secagem tem a finalidade secar a resina fixando a lamínula sobre a lâmina de vidro (esta etapa pode ser feita em estufa a 37° C ou à temperatura ambiente). As lâminas contendo os cortes foram avaliadas em microscópio de luz (14) para avaliação da qualidade dos cortes e coloração, considerando os diferentes tipos de material utilizado (cortes A – E).

5.8 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliação da atividade da mieloperoxidase, marcador quantitativo de neutrófilos, utilizamos a técnica de Bradley et al, 1982. O material coletado, previamente pesado, foi homogeneizado em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio pH 5,4 e, em seguida, foram transferidos 300 µL desse homogenato para microtubos (eppendorf) de 1,5 mL e acrescentados 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% (p/v) diluído em tampão fosfato pH 5,4. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 10.000 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados no ensaio enzimático. O ensaio enzimático foi realizado em microtubos (eppendorf) de 1,5 mL, e a reação seguiu a seguinte ordem: 200 µL dos sobrenadantes das amostras foram adicionados de 100 µL de peróxido de hidrogênio 0,003%, 100 µL de TMB (3,3', 5,5' - tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck); em seguida, essa mistura foi mantida a temperatura ambiente por 2 minutos cronometrados. Posteriormente, a reação foi finalizada com a adição de 100 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) 4 M. Em seguida, foram adicionados 200 µL à microplaca de 96 poços e realizada a leitura espectrofotométrica em comprimento de onda igual a 450 nm. Os resultados foram expressos como índice de MPO (Absorvância em D.O./g de peso úmido da amostra).

5.9 Análise Estatística

Para todos os cálculos estatísticos, nos modelos experimentais *in vivo* e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média ± S.E.M (erro padrão da média). A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, após a verificação pelo

teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov que as variáveis exibiam distribuição normal. Foram utilizados o teste t de *Student* ou ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni quando apropriado. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

6 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto de pesquisa foi registrado e **APROVADO** pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia, que regulamenta a pesquisa envolvendo animais (**PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 097/17 – ANEXO I**).

7 RESULTADOS

7.1 Padronização de modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória em camundongos BALB/c: edema de pata induzido por carragenina

Os resultados obtidos estão representados na Figura 7 e mostram que (1) o edema de pata em camundongos Balb/c foi induzido em ambas as concentrações de carragenina (0,5 e 1,0 % em NaCl) utilizadas; (2) o edema de pata induzido por carragenina (0,5 e 1,0 %) foi mais evidente após 4 e 6 horas a injeção intraplantar; (3) o anti-inflamatório indometacina foi eficaz na redução do edema de pata após 4 e 6 horas a injeção intraplantar de carragenina, em ambas as concentrações utilizadas (0,5 e 1,0 %). Visualmente, foram observados sinais como o aumento de volume e rubor, característicos de um processo inflamatório nos animais tratados com CGN (0,5% ou 1%) por via intraplantar. Nos tempos de 15 e 30 minutos após a injeção de carragenina, sugere-se existir um edema de pata de origem não inflamatória, e sim devido à presença do veículo/carragenina ainda não absorvido pelo tecido. Esses tempos foram retirados para as análises do efeito antiedematogênico do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*. Considerando os resultados obtidos no ensaio de padronização, optou-se pela utilização de carragenina 1,0% para a avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *C. xanthocarpa*.



Figura 6. Edema de pata induzido por carragenina .

Fonte: o autor (2018)

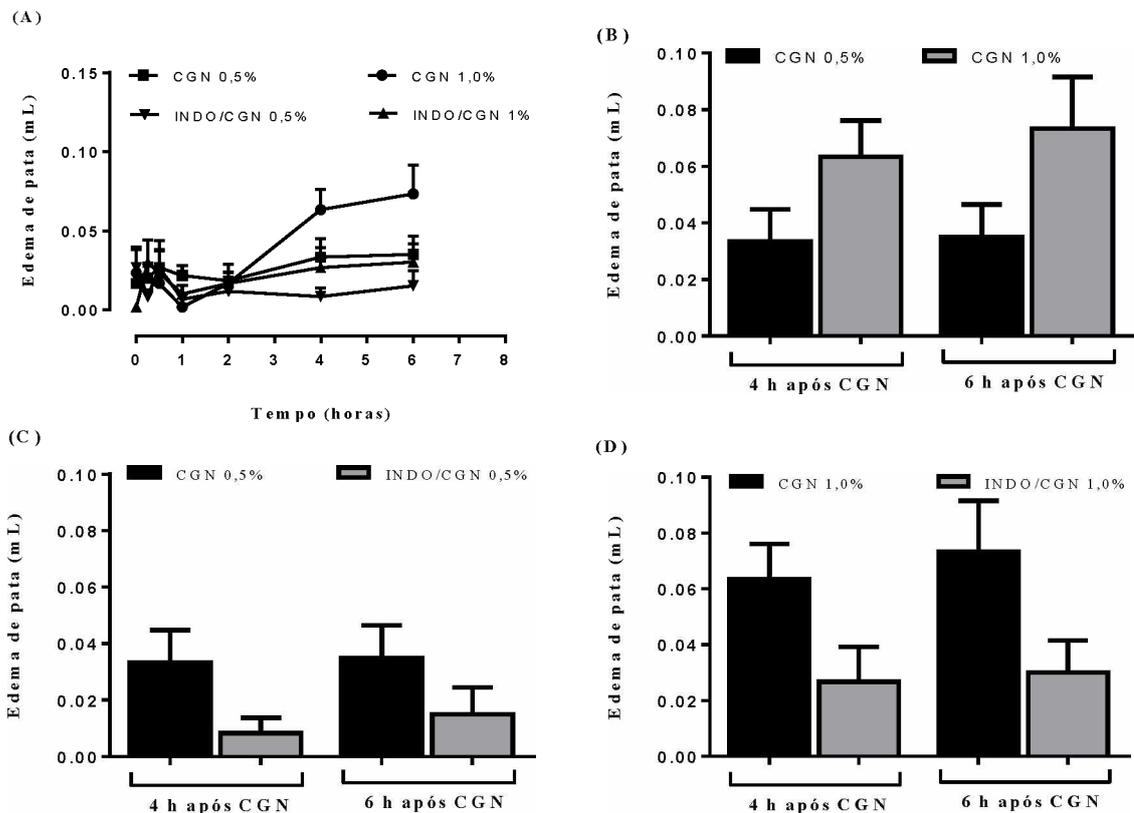


Figura 7. Padronização do método de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c. **(A)** Avaliação tempo-dependente do edema de pata em animais tratados por via oral com: indometacina (INDO; 10 mg/Kg; veículo: carboximetilcelulose; controle positivo) ou apenas carboximetilcelulose (CBX) (controle negativo); e, após 1 hora, tratados com CGN (0,5% ou 1%) por via intraplantar. **(B)** Avaliação do edema de pata após injeção intraplantar de CGN (0,5 e 1%), em animais tratados por via oral apenas com CBX. **(C e D)** Avaliação do edema de pata em animais tratados por via oral com INDO e, após 4 e 6 horas, com injeção intraplantar de CGN 0,5 % **(C)** e 1% **(D)**. Dados representativos de seis observações independentes ($n = 6$) e expressos como média \pm SEM. Significância estatística entre os grupos experimentais: $p > 0,05$ (ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni).

7.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*

A **Figura 8** mostra os resultados obtidos na avaliação tempo-dependente do efeito anti-edematogênico em camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina 1,0%, utilizando-se o anti-inflamatório não esteroide indometacina. O edema de pata foi reduzido nos animais tratados com indometacina. Isto mostra que o anti-inflamatório indometacina, na dose utilizada (10 mg/Kg), constitui um controle positivo para ação anti-inflamatória eficaz no modelo de estudo utilizado.

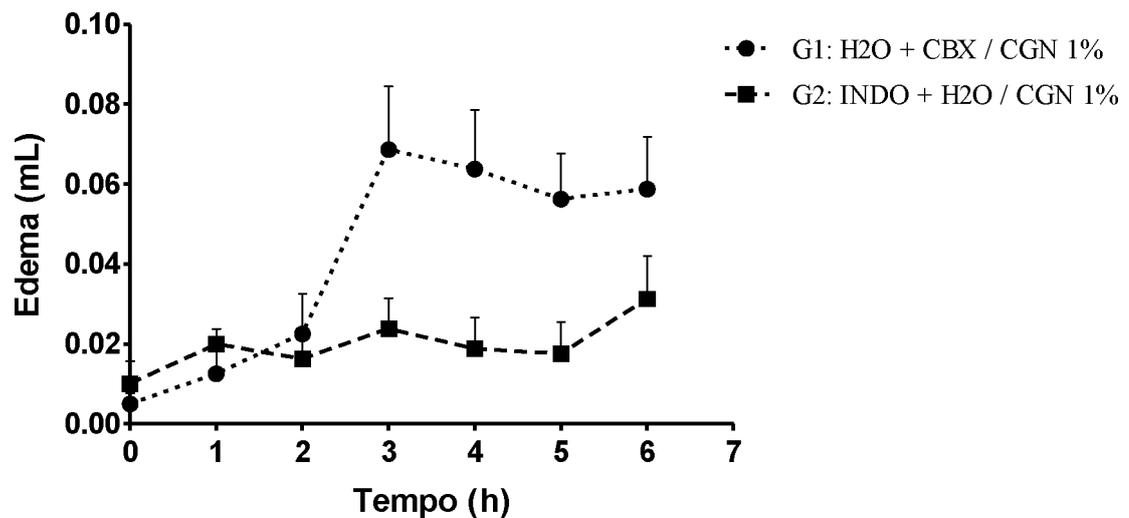


Figura 8. Avaliação do efeito anti-edematogênico do anti-inflamatório indometacina em modelo de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c. Avaliação tempo-dependente do edema de pata em animais tratados por via oral com: indometacina (INDO; 10 mg/Kg; veículo: carboximetilcelulose 0,5% (CBX)) e água destilada (controle positivo); ou apenas CBX e água destilada (controle negativo); e, após 1 hora, tratados com CGN 1,0% por via intraplantar. Dados representativos de oito observações independentes ($n = 8$) e expressos como média \pm SEM. Significância estatística entre os grupos experimentais: $p > 0,05$ (ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni).

A **Figura 9** mostra os resultados obtidos na avaliação tempo-dependente do efeito anti-edematogênico do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* em camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina 1,0%. O edema de pata não foi reduzido nos animais tratados com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*, em todas as concentrações utilizadas (100, 550, 1000 mg/kg).

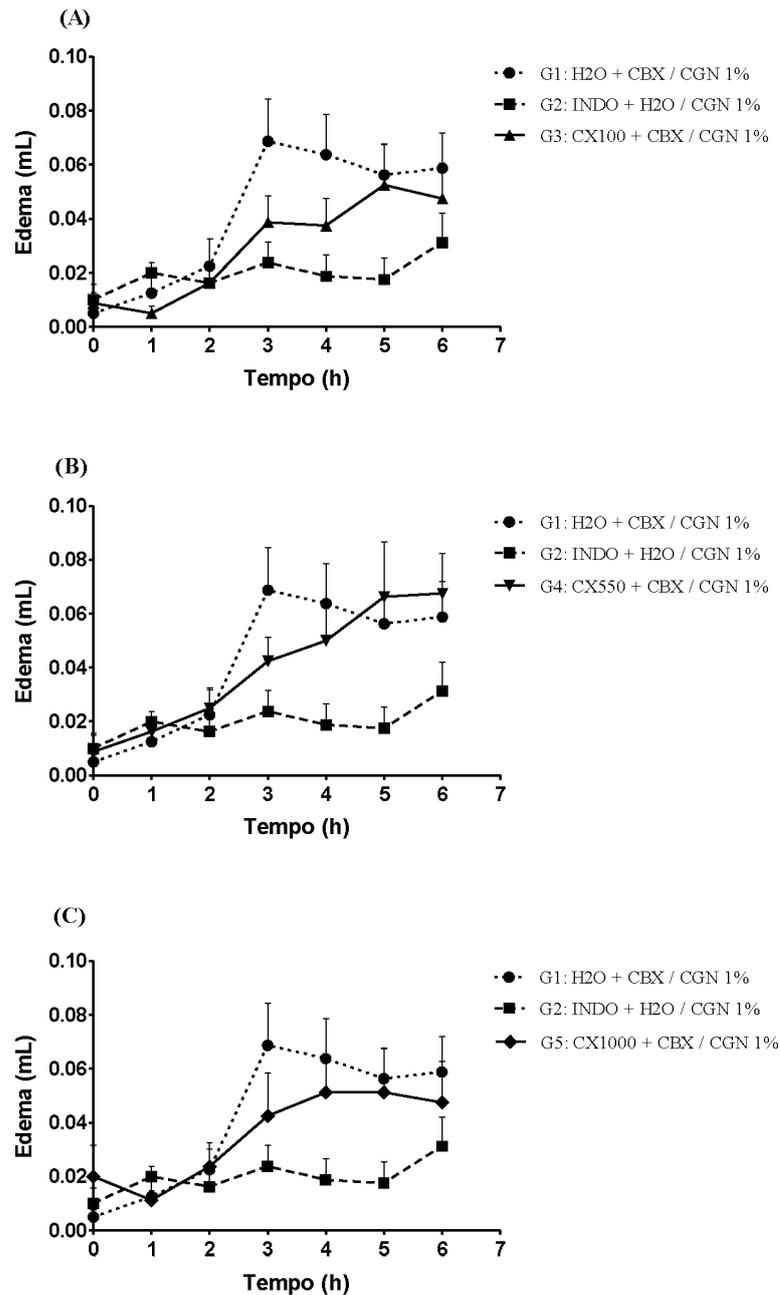


Figura 9. Avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa*. Avaliação do efeito antiedematogênico de diferentes concentrações do extrato aquoso de *C. xanthocarpa* (CX; 100, 550, 1000 mg/Kg) administradas por via oral, em edema de pata induzido por injeção intraplantar de CGN 1,0% em camundongos da linhagem BALB/c. Dados representativos de oito observações independentes (n = 8) e expressos como média \pm SEM. Significância estatística entre os grupos experimentais: $p > 0,05$ (ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni).

7.3 Padronização das preparações de tecido plantar (músculo plantar) para análise histopatológica

A utilização da pata completa (A) para a análise histopatológica tornou-se inviável, visto que, na tentativa de realizar os cortes histológicos, a presença do osso ainda mineralizado impossibilitou a obtenção dos mesmos. Isto também aconteceu com o coxim plantar isolado (B), no qual a presença do osso causou resistência para o corte e conseqüente desinclusão da peça. Já o coxim em corte longitudinal (C), com as peças incluídas com a face do corte voltada para baixo, não houve resistência óssea e, com isso, foi possível a visualização e análise do músculo plantar. Entretanto, os melhores cortes histológicos, com mais fibras musculares preservadas, foram obtidos após procedimento de desmineralização. Tanto o coxim completo (D) quanto o coxim em corte longitudinal (E,) após desmineralização em ácido fórmico 10%, não apresentaram resistência durante a realização dos cortes no micrótomo. Os cortes obtidos, após coloração, possibilitaram as análises histopatológicas no músculo plantar. Portanto, padronizamos a preparação dos cortes histológicos como segue: (1) após eutanásia dos animais, retirar as patas e colocar em formaldeído 10% por, no mínimo 48 horas; (2) após a pré-fixação, remover os dedos para isolar somente o coxim; (3) fazer um corte longitudinal no coxim, sem dividi-lo em duas partes; (4) colocar a peça em ácido fórmico 10%, durante 48 horas; (5) retirar a peça do ácido fórmico e lavar com solução tampão (solução salina tamponada com fosfato, PBS) quatro vezes; (5) iniciar o processamento das peças para inclusão em parafina e coloração.

Tabela 1. Padronização e avaliação do método para obtenção dos cortes histológicos para análise histopatológica do músculo plantar em camundongos BALB/c

Corte realizado a partir de:	Adequação dos cortes para análise histopatológica
Patras completas	-
Coxim plantar	-
Coxim plantar em corte longitudinal	+
Coxim plantar desmineralizado em ácido fórmico 10%	++
Coxim plantar em corte longitudinal desmineralizado em ácido fórmico 10%	+++

Ótimo: +++; Muito Bom: ++; Bom: +; Ruim: -

7.4 Análise histopatológica da padronização dos cortes histológicos

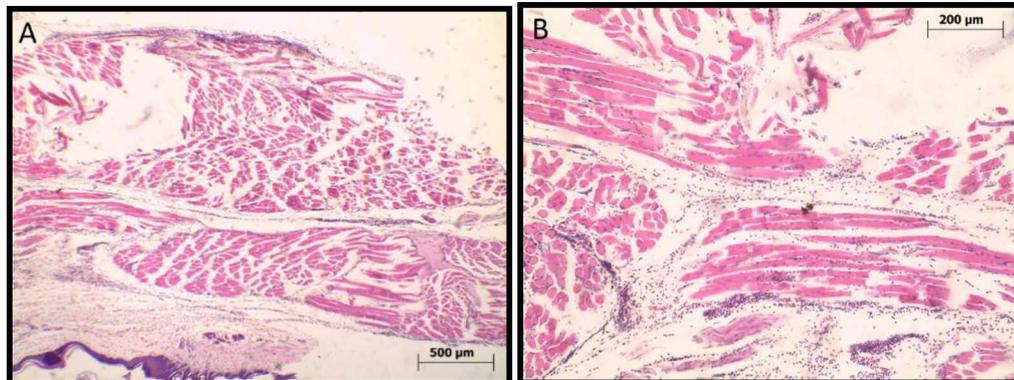


Figura 10. A e B: cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%. (A) aumento de 4x; (B) aumento de 10x. Nos cortes longitudinal e transversal, observa-se feixes de fibras cilíndricas, multinucleadas, com núcleo periférico e presença de infiltrado inflamatório.

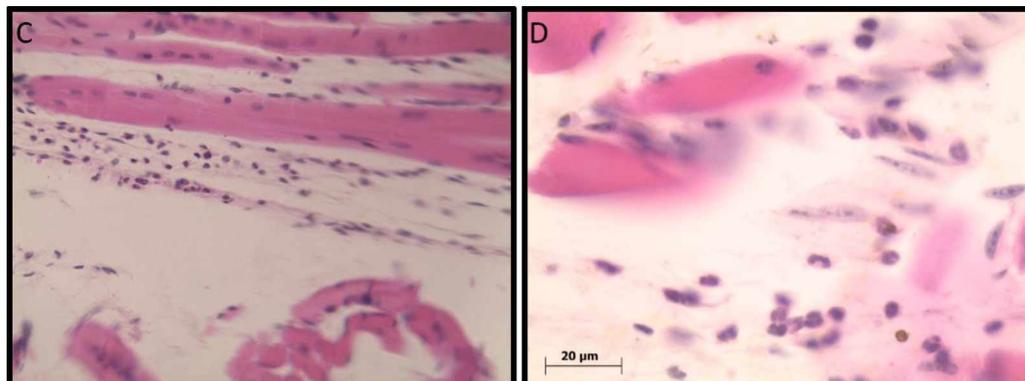


Figura 11. C e D: cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%. (C) aumento de 40x; (D) aumento de 100x. Em (D) observa-se infiltrado neutrofílico e linfocitário, com predominância de polimorfonucleares.

7.5 Dosagem de mieloperoxidase (MPO)

No grupo controle negativo, tratado com carboximetilcelulose (0,5%), foi detectada maior atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), comparada aos demais grupos experimentais, incluindo o grupo controle tratado com indometacina. Nos grupos de animais tratados com extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* nas concentrações de 100, 550 e

1000 mg/kg houve menor atividade MPO, semelhantes àquela atividade observada no grupo controle positivo.

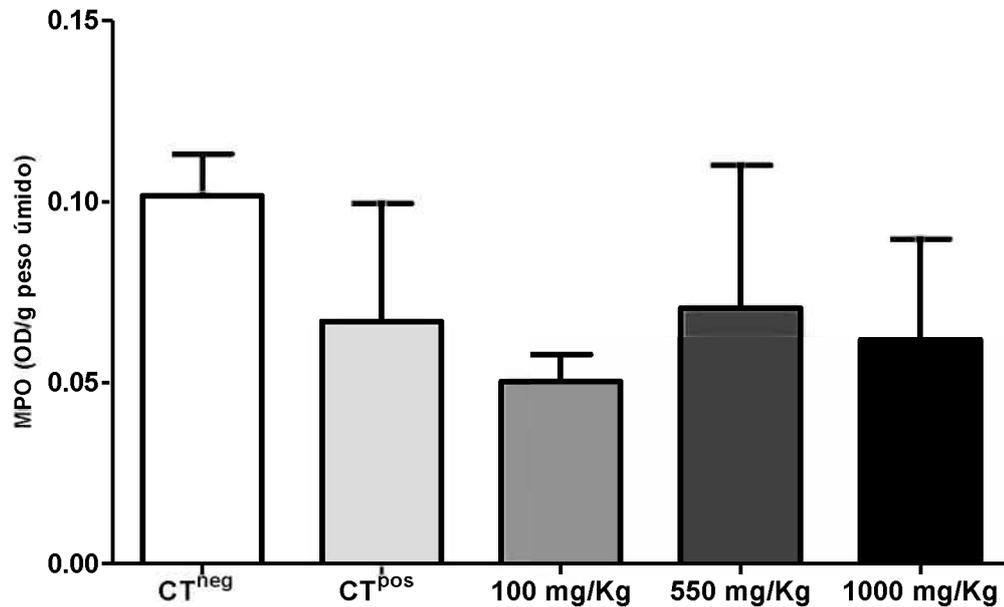


Figura 12. Dosagem de mieloperoxidase (MPO) (D.O./g peso úmido) em amostras teciduais de animais tratados por via oral com carboximetilcelulose (0,5%; grupo controle negativo - CT^{neg}); indometacina (10 mg/kg; grupo controle positivo CT^{pos}); extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* (concentrações 100, 550 e 1000 mg/kg), e, após 60 minutos, tratados com injeção intraplantar de carragenina 1,0%.

8 DISCUSSÃO

O edema de pata induzido por carragenina em camundongos é utilizado em estudos para avaliação da atividade anti-inflamatória. A carragenina é um composto indutor de inflamação e evoca a síntese e liberação de prostaglandinas por células inflamatórias. Esses prostanoídes contribuem e estão associados à dor e alterações vasculares características dos processos inflamatórios agudos, tais como vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, as quais, por sua vez, estão relacionadas ao edema, rubor e calor. A medida do edema induzido por carragenina tem sido um método bastante utilizado nos diferentes modelos experimentais para quantificar efeitos cutâneos da inflamação com diversas espécies vegetais (DA SILVA et al., 2016).

Em estudos com ratos machos Wistar, Da Silva et al. (2016) verificou-se a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico e compostos químicos isolados (2',6'-di-hidroxi-3'-metil-4'-metilchalcona e 2',4'-di-hidroxi-3',5'-dimetil-6'-metilchalcona) de folhas de *Campomanesia xanthocarpa*. No estudo, a dexametasona por via subcutânea foi usada em um grupo experimental como controle positivo para ação anti-inflamatória e, após 1 hora, os animais de todos os grupos experimentais receberam injeção de carragenina 1,0% (50 µL) em uma das patas traseiras. A outra pata recebeu o mesmo volume de solução salina a 0,9% estéril (controle negativo). O volume da pata edema foi medido usando um pletismômetro em 1, 2, 3, e 4 horas após a carragenina. Os resultados foram expressos em mililitros, e a diferença entre os valores das patas direita e esquerda foi quantificada como o volume do edema. Os resultados demonstraram significativa redução do edema de pata induzido por carragenina pelo extrato hidroetanólico e, da mesma forma, pelos compostos químicos isolados das folhas de *Campomanesia xanthocarpa* quando comparado ao grupo controle. Nesse sentido, infere-se uma possível relação entre o tipo de extrato utilizado e os efeitos farmacológicos obtidos por ele, já que, em modelos experimentais semelhantes, os resultados observados quanto ao extrato hidroetanólico representam uma potencial ação anti-inflamatória, diferente do que foi verificado quando utilizado o extrato aquoso da mesma espécie vegetal no presente estudo.

Em outro modelo experimental, a partir do extrato aquoso das folhas de *Bryophillum calycinum*, avaliou-se seu efeito anti-inflamatório sobre o edema de pata de rato induzido por carragenina e dextrana (mediado por histamina e 5-hidroxitriptamina). O extrato aquoso das folhas de *Bryophillum calycinum* causou redução significativa do edema induzido por dextrana

(500 mg/kg) e carragenina (1g/kg), sendo a indometacina e a ciproheptadina os anti-inflamatórios adotados no modelo experimental.

Diante do exposto, o modelo de edema de pata induzido por carragenina para avaliação de ações inflamatória / anti-inflamatória está bem estabelecido na literatura.

Considerando-se os resultados obtidos neste estudo, demonstrou-se que o anti-inflamatório indometacina, um anti-inflamatorio não esteroideal, foi eficiente em reduzir o edema de pata evocado por carragenina. E, da mesma forma que o modelo de edema de pata induzido por carragenina para avaliação anti-inflamatória, o seu uso em modelos experimentais como anti-inflamatório padrão no controle positivo para ação anti-inflamatória já está bem estabelecido em literatura. Desse modo, sugere-se que o modelo experimental padronizado é adequado para avaliação do efeito de substâncias com potencial ação anti-inflamatória em camundongos da linhagem BALB/c. Estes dados corroboram com vários trabalhos da literatura citados anteriormente (SOUSA et al., 2005; FERREIRA et al., 2013; DA SILVA et al., 2016).

No presente estudo, possíveis atividades anti-inflamatórias do extrato aquoso da *C. xanthocarpa* também foram investigados por meio da determinação da atividade da enzima MPO em amostras teciduais de animais tratados com diferentes concentrações do extrato (100, 550 e 1000 mg/Kg) e animais tratados com o veículo carboximetilcelulose ou indometacina, controles negativo e positivo para efeito anti-inflamatório, respectivamente.

A enzima mieloperoxidase (MPO) é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. É liberada imediatamente após ativação dos neutrófilos, contribuindo para a defesa do organismo. Está, geralmente, associada com morte bacteriana e lesão oxidativa tecidual (ROMAN et al., 2008). Portanto, a MPO pode ser considerada um marcador inflamatório de fase aguda (MONTANHER, 2006).

A maior atividade MPO detectada no grupo controle negativo sugere que a injeção de carragenina induziu uma reação inflamatória com infiltrado neutrofílico, dados que corroboram com a análise histopatológica em amostras teciduais desse grupo experimental. O tratamento dos animais com indometacina e com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* nas concentrações 100 e 550 mg/kg, possivelmente, reduziu o infiltrado inflamatório, uma vez que foi detectada menor atividade MPO nesses grupos experimentais.

Dessa forma, o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* não apresentou efeito anti edematogênico embora tenha sido observada a redução de infiltrado neutrofílico no tecido inflamado. Entretanto, as análises estatísticas realizadas com os dados obtidos nos experimentos não foram significantes. Alguns fatores podem ter influenciado nos efeitos observados, dentre

eles, o extrato preparado com folhas jovens, ou até mesmo a utilização de um extrato do tipo aquoso, pode conter menor concentração de metabólitos secundários com atividades anti-inflamatórias, dentre eles, flavonoides e taninos. Assim, os compostos bioativos no extrato utilizado, provavelmente, não modularam negativamente a síntese de mediadores inflamatórios induzidos pela carragenina (histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e óxido nítrico). Outro fator importante que interfere na análise dos resultados obtidos com esse método está relacionado ao tamanho amostral utilizado. De fato, existe uma grande variabilidade interindividual nos animais em resposta ao estímulo de carragenina para desenvolvimento de uma reação inflamatória com edema de pata mensurável. Logo, foram encontrados altos valores para o desvio padrão e o erro padrão da média nos diferentes grupos experimentais e, assim, não foi possível detectar diferenças estatísticas significantes entre os mesmos.

Sant'anna et al. (2017) verificaram efeito hipotensor dose-dependente em ratos normotensos a partir da administração do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa*, em que o mecanismo de ação pode ser mediado pelo sistema renina-angiotensina pelo bloqueio do receptor AT1 (que normalmente se liga à angiotensina II levando à vasoconstrição) e pela resposta autonômica simpática. Isto posto, pode-se correlacionar essa ação como antagonista para um possível efeito antiedematogênico, uma vez que, frente à administração do extrato ocorreu vasodilatação.

Desta maneira, este estudo não confirmou a possível ação anti-inflamatória do extrato aquoso da *C. xanthocarpa* nas condições experimentais utilizadas. Novos experimentos poderão ser realizados para a reavaliação do efeito anti-inflamatório do extrato aquoso da referida espécie, nos quais o modelo experimental aqui utilizado poderá ser aperfeiçoado, utilizando maior número amostral ou, até mesmo, a realização dos tratamentos de forma crônica como já utilizado em modelos experimentais de hipercolesterolemia (VIECILI et al., 2014). Da mesma forma, outros modelos de indução e quantificação do edema de pata poderão ser incluídos, como o edema induzido por sulfato de dextrana, bradicinina ou histamina (FERNANDES, 2002).

9 CONCLUSÕES

- Na padronização do método de edema de pata induzido por carragenina, ambas as concentrações de carragenina utilizadas (0,5 e 1,0 %) foram adequadas para a indução do edema de pata.
- O anti-inflamatório indometacina (10 mg/Kg) foi eficaz na redução do edema de pata induzido por ambas as concentrações de carragenina (0,5 e 1,0 %).
- Indometacina foi mais eficaz na redução do edema de pata após 4 e 6 horas a injeção intraplantar de carragenina 0,5 ou 1%.
- O extrato aquoso de *Campomanesia xanthocarpa* não apresentou efeito antiedematogênico nas condições experimentais utilizadas neste estudo.
- A maior atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) no grupo controle negativo (tratado com carboximetilcelulose 0,5%) corrobora com a presença de infiltrado neutrofilico na análise histopatológica desse grupo experimental.
- A menor atividade da MPO no grupo controle positivo (tratamento com indometacina) sugere menor infiltrado neutrofilico no tecido inflamado.
- A menor atividade da MPO nos grupos tratados com o extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* indica redução da migração neutrofílica para o tecido inflamado em todas as concentrações utilizadas.
- Embora o extrato aquoso da *C. xanthocarpa* não tenha reduzido o edema de pata induzido por carragenina, exibiu efeito anti-inflamatório ao diminuir o infiltrado neutrofilico no tecido inflamado.
- Novos experimentos para investigar possíveis propriedades anti-inflamatórias do extrato aquoso da *Campomanesia xanthocarpa* devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R.; AIMBIRE, F. S. C.; CORREA, F. I.; RIBEIRO, W.; COGO, J. C.; ANTUNES, E.; TEIXEIRA, S. A.; DE NUCCI, G.; CASTRO-FARIA-NETO, H. C.; ZÂNGARO, R. A.; LOPES-MARTINS, R. A. B. **Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw oedema.** Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology, v.74, p.101–107, 2004.
- AUHAREK, S. A.; VIEIRA, M. C.; CARDOSO, C. A. L.; OLIVEIRA, R. J.; CUNHA-LAURA, A. L. **Reproductive toxicity of *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) in female Wistar rats.** Journal of Ethnopharmacology 148: 341–343, 2013.
- BARRONA, J. I. B. **Psicose e Consumo de Canábis: Causa, Consequência ou Coincidência?** Lisboa, 44 p. Mestrado integrado em medicina - Clínica Universitária de Psiquiatria e Psicologia Médica. Universidade de Lisboa, 2017.
- BARROSO, G. M. **Myrtaceae. In: Sistemática de angiosperma do Brasil.** Viçosa: Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa, v. 2, p. 114-126, 1991.
- BIAVATTI, M. W; FARIAS, S. N; PRADO, S. R. T. **Estudos preliminares sobre *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) E Carthagenesis de *Cuphea* (Jacq.) JF Macbr. Extrato aquoso: controle de peso e parâmetros bioquímicos.** J. Ethnopharmacol, v. 393, p.385-389, 2004.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, C. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** Invest Dermatol 78: 206-209, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília: Ministério da Saúde, 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde, 1ª edição), 2009.
- CAVALCANTI, Y. W.; PÉREZ, A. L. A. L.; XAVIER, G. D. R.; ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. **Atividade Antifúngica de Extratos Vegetais Brasileiros sobre Cepas de *Candida*.** Revista Brasileira de Ciências da Saúde 16(1): 43–48, 2012.
- CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H., FIGUEIREDO, M. S. R. B. **Flavonoids: prospective drug candidates.** Mini-Rev. Med. Chem. 8(13):1429-40, 2008.
- COBEA Colégio brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em Bioterismo,** 2ª ed. São Paulo: COBEA, FINEP, p. 259, 1996.
- CONSELHO FEDERAL DE MEDICINA VETERINÁRIA. **Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados -** Brasília, 2012.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. **Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório.** Revista Virtual de Química 1 (3), 241-256, 2009.

DA SILVA, E. R. S.; SALMAZZO, G. R.; ARRIGO, J. S.; OLIVEIRA, R. J.; KASSUYA, C. A. L.; CARDOSO, C. A. L. **Anti-inflammatory Evaluation and Toxicological Analysis of *Campomanesia xanthocarpa* Berg.** Inflammation. Aug;39(4):1462-8, 2016.

FERNANDES, D. **Inibição do edema de pata de camundongo induzido pela injeção de doadores de óxido nítrico: envolvimento da guanilato ciclase solúvel e de canais de potássio.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis: 98 p., 2002.

FERREIRA, L. C.; GUIMARÃES, A. G.; PAULA, C. A.; MICHEL, M. C. P.; GUIMARÃES, R. G.; REZENDE, S. A.; SOUZA-FILHO, J. D.; GUIMARÃES, D. A. S. **Anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Campomanesia adamantium*.** Journal of Ethnopharmacology 145: 100–108, 2013.

GOGOSZ, A. M.; COSMO, N. L.; BONNA, C.; SOUZA, L. A. **Morfoanatomia da plântula de *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. (Myrtaceae).** São Paulo: Sociedade Botânica do Brasil v.24 (3): 613-623, 2010.

KLAFKE, J. Z.; PEREIRA, R. L.; HIRSCH G. E.; PARISI, M. M.; PORTO, F. G.; de ALMEIDA, A. S.; RUBIN, F. H.; SCHIMIDT, A.; BEUTLER, H.; NASCIMENTO, S.; TREVISAN, G.; BRUSCO, I.; de OLIVEIRA, S. M.; DUARTE, M. M.; DUARTE, T.; VIECILI, P. R. **Study of oxidative and inflammatory parameters in LDLr-KO mice treated with a hypercholesterolemic diet: Comparison between the use of *Campomanesia xanthocarpa* and acetylsalicylic acid.** Phytomedicine, 23(11), 1227–1234, 2016.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; PANIGAS, T. F.; BELLI, K. C.; OLIVEIRA, M. F.; BARICHELLO, M. M.; RIGO, F. K.; ROSSATO, M. F.; SANTOS, A. R. S.; PIZZOLATTI, M. G.; FERREIRA, J.; VIECILI, P. R. N. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on biochemical, hematological and oxidative stress parameters in hypercholesterolemic patients.** Journal of Ethnopharmacology 127(2): 299–305, 2010.

KLAFKE, J. Z.; SILVA, M. A.; ROSSATO, M. F.; TREVISAN, G.; WALKER, C. I. B.; LEAL, C. A. M.; BORGES, D. O.; SCHETINGER, M. R. C.; MORESCO, R. N.; DUARTE, M. M. M. F.; SANTOS, A. R. S.; VIECILI, P. R. N.; FERREIRA, J. **Antiplatelet, Antithrombotic, and Fibrinolytic Activities of *Campomanesia xanthocarpa*.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine 954748, 2012.

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

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. **Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (*Imburana-de-cheiro*).** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.3, pp. 415-422, 2013.

MARKMAN, B. E. O. **Caracterização farmagnóstica de *Campomanesia xanthocarpa* Myrtaceae**. São Paulo, 169 p. Dissertação - (Mestre em Farmacognosia), Faculdade de Farmácia, Universidade de São Paulo, 2002.

MARKMAN, B. E.; BACCHI E.M.; KATO E.T. **Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa***. Journal Ethnopharmacol. Sep;94(1):55-7, 2004.

MONTANHER, A. B. P. **Estudo do mecanismo de ação dos extratos de *Passiflora edulis* variação flavicapa Degener em modelos de inflamação aguda, em camundongos**. Dissertação - (Mestre em Farmácia), Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, 2006.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L.; AMORIM, E. L. C. **Taninos: uma abordagem da química à ecologia**. São Paulo, Quím. Nova, v. 28, n.5, 2005.

OTERO, J. S.; HIRSC, G. E.; KLAFKE, J. Z.; PORTO, F. G.; ALMEIDA, A. S.; NASCIMENTO, S.; SCHIMIDT, A.; SILVA, B.; PEREIRA, R. L. D.; JASKULSKY, M.; PARISI, M. M.; SANTOS GUARDA, N.; MORESCO, R. N.; AITA, C. A. M.; VIECILI, P. R. N. **Inhibitory effect of *Campomanesia xanthocarpa* in platelet aggregation: Comparison and synergism with acetylsalicylic acid**. Thrombosis Research, 154, 42–49, 2017.

PASTORI, T.; FLORES, F. C.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; SILVA, C. B.; CANTO-DOROW, T. S.; TEDESCO, S. B. **Genotoxic effects of *Campomanesia xanthocarpa* extracts on *Allium cepa* vegetal system**. Pharmaceutical Biology 51(10): 1249–1255, 2013.

PRADO, L. C.; SILVA, D. B.; DE OLIVEIRA-SILVA, G. L.; HIRAKI K. R.; CANABRAVA, H. A.; BISPO-DA-SILVA, L. B. **The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins**. Biol Pharm Bull; 37: 722-730, 2014.

ROMAN, R. M.; WENDLAND, A.E.; POLANCZYK C.A. **Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice**. Arq Bras Cardiol, 2008, 91:11-9.

SANT'ANNA, L. S.; MERLUGO, L.; EHLE, C. S.; LIMBERGER, J.; FERNANDES, M. B.; SANTOS M. C.; MENDEZ, A. S.; PAULA, F. R.; MOREIRA, C. M. 2017. **Chemical Composition and Hypotensive Effect of *Campomanesia xanthocarpa***. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, volume 2017.

SOUSA, P. J. C.; ROCHA, J. C. S.; PESSOA, A. M.; ALVES, L. A. D.; CARVALHO, J. C. T. **Estudo preliminar da atividade antiinflamatória de *Bryophillum calycinum* Salisb**. João Pessoa. Rev. bras. farmacogn. v.15, n.1, jan./mar. 2005.

VALLILO, M. I.; MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L. **Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos v.28, supl.0, dec. 2008.

VAN ARMAN, C. G.; BEGANY, J.; MILLER, L. M.; PLESS, H. H. **Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan.** The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, v. 150, p. 328-34, 1965.

VIECILI, P. R. N.; BORGES, D. O.; KIRSTEN, K.; MALHEIROS, J.; VIECILI, E.; MELO, R. D.; TREVISAN, G.; SILVA, M. A.; BOCHI, G. V.; MORESCO, R. N.; KLAFKE, J. Z. **Effects of *Campomanesia xanthocarpa* on inflammatory processes, oxidative stress, endothelial dysfunction and lipid biomarkers in hypercholesterolemic individuals.** Atherosclerosis 234: 85–92, 2014.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315
Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;
e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 204/17 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 097/17

Projeto Pesquisa: "Estudo da Atividade Farmacológica Anti-inflamatória do Extrato de *Campomanesia xanthocarpa* (Myrtaceae) DC em modelo experimental in vivo."

Pesquisador Responsável: Celene Maria de Oliveira Simões Alves

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: A CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 27 de novembro de 2017.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Cameiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU
Portaria nº 665/17