

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

PÂMELLA CÁSSIA PIMENTA BARBOSA

ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Annona crassiflora* EM MODELO EXPERIMENTAL *in vivo*

UBERLÂNDIA

2018

PÂMELLA CÁSSIA PIMENTA BARBOSA

ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Annona crassiflora*
EM MODELO EXPERIMENTAL *in vivo*

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Faculdade de Medicina Veterinária, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito para aprovação na disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso II (TCC II, GMV054).

Área de concentração: Farmacologia veterinária.

Orientador: Profa. Dra. Celene Maria de Oliveira Simões Alves.

UBERLÂNDIA

2018

ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA DO EXTRATO AQUOSO DE *Annona crassiflora*
EM MODELO EXPERIMENTAL *in vivo*

Trabalho de conclusão de curso aprovado como requisito parcial à obtenção do grau de Médico Veterinário no curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia.

Uberlândia, 21 de dezembro de 2018.

Prof^ª Dr^ª Celene Maria de Oliveira Simões Alves, UFU/MG

Prof^ª Dr^ª Benvinda Rosalina dos Santos, UFU/MG

Prof. Me. Bruno Antônio Ferreira, UFU/MG

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, cuja proteção tem me guiado por toda a vida.

Aos meus amigos, agradeço pelas alegrias, tristezas e momentos compartilhados. Com vocês, até os piores dias viraram festa e ficaram para a eternidade na nossa memória. Em especial, agradeço à Natália e Viviane que participaram ativamente deste projeto e da minha vida, sem vocês nada disso seria possível; Iago e Marina que me ajudaram a esquecer todos os dias de dificuldades, reclamando sempre comigo e me ajudando a aceitar melhor as coisas que não estavam sob meu controle; à mesa rosa, representada por Marina, Bethânia, Jéssica, Vitória e Thaís, por não me deixar desistir nesta reta final do curso que foi um grande desafio para aqueles que, como eu, tem maior afinidade com os pequenos animais; e ao meu namorado, Victor, que ficou ao meu lado mesmo quando eu tive meus ataques de impaciência e não mereci todo o seu carinho.

Ao pessoal do laboratório, em especial Taís e Bruno, que me auxiliaram no trabalho, sempre de prontidão, deixando muitas vezes seus afazeres para que não perdêssemos o “timing” dos experimentos.

À minha orientadora, Celene, agradeço por todos os momentos em que a procurei desesperada com as várias intemperes ocorridas durante nosso projeto e encontrei paciência para seguir adiante. Agradeço também por todo conhecimento fornecido, o qual levarei sempre para minha vida acadêmica e também pessoal.

E o que dizer a você mãe? Obrigada pela paciência, por sua capacidade de acreditar e investir em mim, pelo incentivo, pela força e, principalmente, pelo carinho. Seu cuidado e dedicação foi que me deram, em alguns momentos, a esperança para seguir. Sua presença significou segurança e certeza de que não estou sozinha nessa caminhada. Valeu a pena toda distância, todo sofrimento, todas as renúncias e vitórias que não comemoramos juntas. Hoje estamos colhendo juntas os frutos do nosso empenho! Esta vitória é muito mais sua do que minha.

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de carácter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

(Arthur Schopenhauer)

RESUMO

Flavonoides e taninos são metabólitos secundários da classe dos polifenóis constantemente encontrados em frutas, flores, folhas e vegetais, aos quais são atribuídas atividades anti-inflamatórias. Em muitas espécies vegetais do cerrado brasileiro já foram identificadas essas substâncias, como na *Annona crassiflora*, conhecida como Marolo ou Araticum, cujo fruto é amplamente consumido. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial antiedematogênico do extrato aquoso de suas folhas, apesar de já ser amplamente utilizada por nativos desse bioma no tratamento de diversas desordens de natureza inflamatória. Para essa investigação, avaliou-se o edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina em animais de cinco grupos tratados previamente com veículo, indometacina e extrato à concentração de 100 mg/Kg, 550 mg/Kg e 1000 mg/Kg, respectivamente. Para além disso, também foi avaliada a atividade de neutrófilos, por meio da enzima mieloperoxidase, e as alterações histopatológicas ocasionadas no músculo plantar dos animais. Como resultado, não observou-se redução do edema de pata induzido por carragenina nos animais tratados com as concentrações de 100 mg/Kg e 1000 mg/Kg do extrato. Entretanto, na concentração de 550 mg/Kg houve redução do edema, porém sem significância estatística. Quanto à atividade da enzima mieloperoxidase, não foi possível identificar redução de sua atividade nos grupos tratados com as diferentes concentrações do extrato. Conclui-se então que o extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora*, em modelo experimental *in vivo*, não apresentou efeito antiedematogênico.

Palavras-chave: araticum. marolo. flavonoides. anti-inflamatório. *Annona crassiflora*.

ABSTRACT

Flavonoids and tannins are secondary metabolites of the class of polyphenols constantly found in fruits, flowers, leaves and vegetables, to which anti-inflammatory activities are attributed. In many plant species of the Brazilian cerrado, these substances have already been identified, as in *Annona crassiflora*, known as Marolo or Araticum, whose fruit is widely consumed. However, there are no studies that have evaluated the anti-nematode potential of the aqueous extract of its leaves, although it is already widely used by natives of this biome in the treatment of various inflammatory disorders. For this investigation, the paw edema induced by intraplantar injection of carrageenin in animals from five previously treated groups with vehicle, indomethacin and extract at the concentration of 100 mg/kg, 550 mg/kg and 1000 mg/kg, respectively, was evaluated. In addition, the activity of neutrophils, through the enzyme myeloperoxidase, and the histopathological changes in the plantar muscle of the animals were also evaluated. As a result, no reduction of carrageenin-induced paw edema was observed in the treated animals at the concentrations of 100 mg/kg and 1000 mg/kg of the extract. However, at the concentration of 550 mg/kg, edema was reduced, but without statistical significance. Regarding the activity of the enzyme myeloperoxidase, it was not possible to identify the reduction of its activity in the groups treated with the different concentrations of the extract. It was concluded that the aqueous extract of the leaves of *A. crassiflora*, in an experimental model *in vivo*, did not present antiedematogenic effect.

Keywords: araticum. marolo. flavonoids. anti-inflammatory. *Annona crassiflora*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	<i>Annona crassiflora</i> (araticum)	14
FIGURA 2	Obtenção do extrato aquoso das folhas de <i>A. crassiflora</i>	20
FIGURA 3	Gavagem	21
FIGURA 4	Injeção intraplantar	21
FIGURA 5	Pletismômetro	21
FIGURA 6	Preparação dos animais para os procedimentos	23
FIGURA 7	Tratamentos por via oral	24
FIGURA 8	Tratamentos por via injeção intraplantar	24
FIGURA 9	Tratamentos por vias oral e injeção intraplantar	26
FIGURA 10	Processamento das amostras para avaliação da atividade da MPO	27
FIGURA 11	Padronização dos cortes histológicos	27
GRÁFICO 1	Padronização do método de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c	33
GRÁFICO 2	Avaliação do efeito antiedematogênico do anti-inflamatório indometacina em modelo de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c	34
GRÁFICO 3	Avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>Annona crassiflora</i>	35
GRÁFICO 4	Avaliação da atividade da MPO	36
FIGURA 12	Cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%	37

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Técnica de inclusão em parafina	28
TABELA 2	Técnica de coloração hematoxilina e eosina	29

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	JUSTIFICATIVA	12
3	REFERENCIAL TEÓRICO	13
3.1	Cerrado como fonte de plantas medicinais	13
3.2	<i>Annona crassiflora</i>	14
3.3	Propriedades biológicas e farmacológicas	15
4	OBJETIVO	18
4.1	Objetivo geral	18
4.2	Objetivos Específicos	18
5	MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1	Condição ambiental	19
5.2	Material vegetal	19
5.3	Obtenção do extrato aquoso	19
5.4	Animais	20
5.5	Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios	22
5.5.1	<i>Edema de pata induzido por carragenina</i>	22
5.5.1.1	<i>Padronização da concentração de carragenina</i>	22
5.5.1.2	<i>Avaliação do efeito antiedematogênico de diferentes concentrações do extrato aquoso de Annona crassiflora</i>	24
5.5.2	<i>Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)</i>	26
5.5.3	<i>Análise histopatológica</i>	27
5.5.3.1	<i>Padronização dos cortes histológicos</i>	27
5.5.3.2	<i>Análise histopatológica</i>	28
5.6	Protocolo de eutanásia	30
5.7	Análise Estatística	31
6	RESULTADOS	32

6.1	Padronização de modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória em camundongos BALB/c: edema de pata induzido por carragenina	32
6.2	Efeito antiedematogênico do extrato aquoso da <i>Annona crassiflora</i>	32
6.3	Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	35
6.4	Padronização para análise histopatológica	36
7	DISCUSSÃO	38
8	CONCLUSÃO	39
	REFERÊNCIA	40
	ANEXO A	45

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais representam uma opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente para a população de baixa renda. Pesquisas científicas que divulgam propriedades terapêuticas de determinadas plantas medicinais, contribuem fortemente para validar ou não o uso popular dessas plantas, no sentido de encorajar ou desencorajar esse costume, e para a descoberta de novas drogas de origem vegetal com potencial uso farmacológico / terapêutico.

Além disso, com o crescente mercado direcionado a animais de estimação e o aumento da preocupação com sua saúde e bem-estar, a utilização de fontes naturais e renováveis como recursos para o tratamento de condições patológicas, por exemplo, é uma forte tendência para o novo estilo de vida saudável dos proprietários.

O “marolo” ou “araticum”, planta típica do cerrado brasileiro, já é amplamente utilizada na medicina popular e é classificada cientificamente como pertencente ao reino Plantae, divisão Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Magnoliales, família Annonaceae, gênero *Annona* e espécie *Annona crassiflora*. Seus exemplares possuem características de árvores lenhosas com folhas de disposição alterna dística, flores grandes e estruturadas com três pétalas e três sépalas cada, e frutos apocárpicos com frutículos separados, polpa doce e succulenta, cor amarelada e odor peculiar (JOLY, 1975).

Dado seu uso já difundido entre a população nativa do cerrado, a *A. crassiflora* se apresenta como um bom exemplar para a investigação de suas propriedades farmacológicas, as quais têm sido atribuídas à presença de substâncias da classe dos polifenóis, como os seus metabólitos secundários flavonoides e os taninos. Uma vez que estudos têm demonstrado que estas substâncias possuem atividades anti-inflamatórias, justifica-se investigar o possível papel da *A. crassiflora* no controle de processos inflamatórios.

2 JUSTIFICATIVA

Assim, considerando o uso popular já difundido pelos nativos do cerrado brasileiro da *A. crassiflora* no tratamento de diversas desordens, existem boas perspectivas para que essa espécie vegetal seja fonte de substâncias farmacologicamente ativas no tratamento da dor e de processos inflamatórios. Até o presente momento, estudos da literatura já demonstraram atividades farmacológicas da espécie *A. crassiflora* em várias condições patológicas, entretanto, ainda não foram investigadas propriedades anti-inflamatórias utilizando o extrato aquoso de suas folhas.

Desse modo, o objetivo geral deste trabalho foi avaliar o efeito farmacológico antiedematogênico do extrato aquoso obtido das folhas da planta *Annona crassiflora* utilizando um modelo experimental *in vivo*, na intenção de se comprovar cientificamente seu uso e eficácia, contribuindo para a pesquisa farmacológica e para o desenvolvimento de novas drogas, bem como para uma maior conscientização na utilização de princípios ativos de origens renováveis e para a importância da conservação do bioma cerrado que vem se apresentando como fonte significativa de objetos de estudo em suas flora e fauna.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Cerrado como fonte de plantas medicinais

Considerado um dos “hotspots” de biodiversidade do mundo, o Cerrado brasileiro ocupa uma área de mais de 2 milhões km^2 , cerca de 25% do território nacional, e representa o segundo maior bioma da América do Sul, além de ser a mais rica savana tropical do planeta em termos de biodiversidade (MYERS, 2000; SANO et al., 2010). No entanto, o uso indiscriminado do seu território pela atividade agropecuária promove, a cada ano, uma perda de cerca de 11 mil km^2 de sua cobertura vegetal original (BEUCHLE et al., 2015). Dessa forma, teve nos últimos 50 anos, aproximadamente, 50% de sua extensão convertida em pastagens e plantações, o que levou à extinção de muitas espécies de plantas (ALMEIDA et al., 1998).

Contudo, esse rico bioma abriga por volta de 320 mil espécies animais e mais de 11 mil espécies de plantas, muitas endêmicas, que vem chamando atenção como fontes de compostos químicos com atividades biológicas e propriedades farmacológicas (VIOLANTE et al., 2012; CAMPELO, 2017). A exposição dessa cobertura vegetal à intensa seca, radiação ultravioleta, alimentação de herbívoros e infecções fúngicas, pode ser a causa de se encontrar altas concentrações de metabólitos secundários de compostos polifenólicos, como flavonoides, taninos e antocianinas, na maioria das plantas do Cerrado (FANK-DE-CARVALHO et al., 2015; ALBUQUERQUE; RAMOS; MELO, 2012). Tais substâncias são apontadas como responsáveis pelas propriedades terapêuticas dessas plantas, baseadas em suas atividades antioxidante, quimiopreventiva, citoprotetora, antimutagênica, antiestrogênica e antiangiogênica, dentre inúmeras outras já descritas (SUN; HEILMANN; KONIG, 2015).

As plantas medicinais são reconhecidas como matérias-primas importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas. Estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos atualmente disponíveis, foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001; BRASIL, 2016).

O Brasil é o país que detém a maior parcela da biodiversidade mundial, em torno de 15% a 20% do total. Entre os elementos que compõem a biodiversidade, as plantas constituem importantes recursos naturais para a fabricação de fitoterápicos e outros medicamentos (BRASIL, 2016), passíveis de uso tanto na medicina humana, quanto na medicina veterinária.

3.2 *Annona Crassiflora*

A família Annonaceae é uma grande representante da flora pertencente ao Cerrado brasileiro e compreende, aproximadamente, 27 gêneros e 290 espécies de plantas usadas pela medicina popular como agentes antiparasitários, antitumorais e no tratamento de distúrbios intestinais, picadas de cobra e doença de chagas (ROESLER et al., 2007; SANO et al., 2010; FORMAGIO et al., 2015). As principais características da família são:

Plantas lenhosas (árvores ou arbustos), com folhas inteiras de disposição alternada, sem estípulas. As flores são isoladas ou reunidas em inflorescências, grandes ou pequenas, hemicíclicas, hermafroditas, diclamídeas, com perianto diferenciado em cálice e corola, em geral trímeros (3 sépalos e 3 pétalas) carnosos. Estames muito numerosos, dispostos espiraladamente. Ovário súpero com carpelos muito numerosos dispostos em geral espiraladamente, livres entre si (raramente soldados) apocárpico, com um a muitos óvulos. Fruto apocárpico baciforme (raramente seco capsular e com frutículo separado, como em *Xilopia*). Semente caracteristicamente com endosperma ruminado. (JOLY, 1975, p. 777 apud BRASIL, 2016).

Dentre as espécies dessa família encontra-se a *Annona crassiflora*, cujo fruto é popularmente conhecido como “marolo” ou “araticum” (Figura 1), uma polpa doce, de aroma peculiar e, geralmente, consumida *in natura* (VIEIRA et al., 2006; ROESLER et al., 2007; SANO et al., 2010). Seu fruto possui cerca de 15cm de diâmetro, até 2 kg de peso, é oval arredondado, externamente marrom claro com polpa creme amarelada firme, sementes numerosas, elípticas e marrom escuras (ALMEIDA et al., 1998, p.464 apud BRASIL, 2016). É um exemplar da família de porte arbóreo, medindo entre 4 a 8 metros de altura, com tronco geralmente tortuoso de 20 a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa; folhas alternas simples; flores axilares, com pétalas engrossadas e carnosas (LORENZI, 1998).

FIGURA 1 - *Annona crassiflora* (araticum).



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/40115752@N00/3340877451>

3.3 Propriedades biológicas e farmacológicas

Em análise da casca do araticum, por meio de cromatografia líquida de alta performance acoplada a ionização por “eletrospray” e espectrometria de massa em tempo ultrassônico, foram descritos 142 fitoquímicos, dos quais 123 nunca foram reportados como matéria prima (ARRUDA et al., 2018). Fenólicos totais, flavonoides, taninos condensados, catequinas, epicatequinas, entre outras substâncias com atividade antioxidante, foram identificadas, em ordem crescente de concentração, na casca, polpa e sementes, sendo cada composto encontrado em partes específicas do araticum (ARRUDA et al., 2017). Em outro estudo, com o uso de espectrometria de massa com ionização por “eletrospray” de infusão direta, verificou-se a presença de importantes compostos bioativos nos extratos etanoicos da casca e das sementes do araticum, como ácido ascórbico, ácido cafeico, ácido quínico, ácido ferulico, xantoxilina e rutina, aos quais já foram atribuídas atividades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, antiparasitária e anti-inflamatória (LEBOEUF et al., 1982; ROESLER et al., 2006; ROESLER et al., 2007; LI et al., 2012).

Uma importante atividade biológica encontrada em frações do extrato da casca da *Annona crassiflora* enriquecidas com polifenol foi a de hepatoprotetora, propriedade importante para a prevenção e terapia de complicações relacionadas a diversas desordens hepáticas (ROESLER et al., 2007). Outros compostos identificados por meio de cromatografia líquida de alta eficiência com o uso de ionização por “eletrospray”, como etilacetato e n-butanol, extraídos do extrato etanoico de sua casca, demonstraram atividades inibitórias *in vitro* sobre enzimas, como a α -amilase e a α -glucosidase que participam do processo de glicólise nos diferentes tecidos do organismo (JUSTINO et al., 2016), além de alta atividade antioxidante e hepatoprotetora, acompanhada de baixa hepatotoxicidade observadas em experimento onde buscou-se tratar ratos submetidos a diabetes induzida por estreptozocina com uma fração do extrato da casca enriquecida com polifenóis. Nesse caso, foi possível avaliar no soro sanguíneo decréscimo da alanina aminotransferase (ALT), aspartato amino transferase (AST) e da fosfatase alcalina (FAL), bem como redução da peroxidação lipídica hepática, nitração e peroxidação proteica, decréscimo dos níveis de sintase do óxido nítrico e da atividade e expressão da glutathiona peroxidase, superóxido desmutase e catalase (JUSTINO et al., 2017). Essas propriedades foram atribuídas a substâncias, como ácido clorogênico, epicatequinas, hexosídeos de caffeoil, glicosídeos de quercetina e kaempferol, componentes dessas frações (JUSTINO et al., 2016).

Outra propriedade significativa recentemente descrita do extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora*, é sua capacidade antidiarreica quando administrada por via oral em cobaias que receberam óleo de mamona como laxante. Foi possível verificar atividade procinética e inibição da ação do laxante, que foram atribuídas à sua habilidade de inibir a secreção intestinal e/ou reduzir a absorção intestinal (FERRAZ et al., 2017).

Os extratos da folha e semente de *Annona crassiflora* apresentaram efeitos citotóxicos consideráveis, atingindo 85% de inibição da proliferação celular, quando testados em linhagens de cultura de células de carcinoma de cólon, leucemia, tumor cerebral e melanoma humanos (MESQUITA et al., 2009). Em diversos outros estudos, as atividades antiproliferativa e anticolinesterásica demonstradas pelo extrato de suas sementes, em testes *in vitro*, são atribuídos à alta concentração de ácidos fenólicos encontrados em sua composição, como ácido cafeico, ácido sinapínico, ácido ferúlico e outros flavonoides (FORMAGIO, et al., 2015; ROESLER et al., 2006; SZWAJGIER; BOROWIEC, 2012). Além disso, já se tem descrita a atividade de seu extrato bruto e porções derivadas sobre linhagens de células de câncer cervical onde apresentou a capacidade de alterar significativamente a viabilidade, proliferação e migração, além de induzir a morte de células cancerígenas. Ainda nesse trabalho, foi verificado a atividade citotóxica da porção hexanoica do extrato bruto quando associado ao tratamento com cisplatina *in vitro*, assim como dano ao DNA e apoptose celular por via intrínseca, levando à diminuição no tamanho do tumor *in vivo* (SILVA, 2018; OLIVEIRA et al., 2018).

Em diversos estudos é possível encontrar, já elucidadas, propriedades antimicrobiana e antiparasitária nos extratos de suas folhas, sementes, casca e polpa da fruta, onde foram comprovadas suas ações bactericida (LAGE et al., 2014; SILVA JUNIOR et al., 2014; ROCHA et al., 2015), antimalárica (PIMENTA et al., 2014), larvicida (DE OMENA et al., 2007; ROCHA et al., 2015), moluscocida (SANTOS; SANT'ANA, 2001), nematocida (MACHADO et al., 2015), antileishmania e trypanocida (MESQUITA et al., 2005). E ainda nessa linha de investigação, recente estudo traz descrito potente atividade bactericida do extrato etanoico de *Annona crassiflora* no tratamento contra bactérias multirresistentes, como *Escherichia coli* e *Staphylococcus spp*, causadores de diarreia em ovinos e mastite em bovinos (RIBEIRO et al., 2018).

A substância obtida da extração hidroalcoólica a partir de sementes desidratadas de *A. crassiflora* apresentou inibição não-específica da contração do íleo de cobaias induzida por drogas, ao promover redução da permeabilidade ao cálcio nas membranas de células da musculatura lisa intestinal. Esse mecanismo pode explicar o uso comum desse princípio pela medicina popular em casos de picadas de cobra, cujo veneno é um complexo enzimático

dependentes de cálcio, pH e temperaturas ideais para sua ação. (WEINBERG et al., 1993; BRASIL, 2005).

Analisando amostras de medula óssea de animais tratados com extrato etanoico de araticum, foi possível identificar redução da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, que representam uma sensível resposta a dano celular devido ionização ou mutação química, obtidos a partir de coleta da medula óssea de animais tratados com o extrato quando associado ao quimioterápico Mitomicina C, demonstrando sua atividade antimutagênica. Ainda foi possível identificar redução de eritrócitos policromáticos em relação aos normocorados, indicando atividade citotóxica sem ação mutagênica. Tais resultados foram atribuídos às acetogeninas encontradas no extrato (VILAR et al., 2008).

Em estudo fitoquímico da porção hidroalcoólica do extrato de folhas desidratadas de *A. crassiflora* realizado a partir de cromatografia em coluna de poliamida de fase reversa, revelou a presença de pentatosídeo que, análogo à quercetina, é um flavonoide com diversas propriedades farmacológicas, entre elas, atividade analgésica (OLIVEIRA et al., 2016; NAIDU; SINGH; KULKARNI, 2003; WILLAIN FILHO et al., 2008). Outras investigações relacionam essa atividade à interação que ocorre entre a quercetina e os receptores canabinoides periféricos CB2 (SHRINIVASAN et al., 2012), interação essa apontada em vários experimentos como desencadeadora de antinocicepção periférica (HOMANN, 2002; KAUR, SINGH, CHOPRA, 2005). Já em trabalho atual, onde se analisou o comportamento de ratos submetidos a nocicepção induzida por formalina e tratados, posteriormente, com filtrado ou precipitado do extrato hidroalcoólico de suas folhas, verificou-se que nos dois tratamentos houve redução no tempo de lambida, porém somente o precipitado apresentou efeito dose-dependente, confirmando sua ação analgésica (OLIVEIRA et al., 2018).

4 OBJETIVO

4.1 Objetivo geral

A presente proposta experimental teve como objetivo avaliar a atividade farmacológica antiedematogênica do extrato aquoso obtido a partir de folhas da planta *Annona crassiflora* usando um modelo experimental *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos

Preparar extrato aquoso de *Annona crassiflora*;

Avaliar efeitos farmacológicos anti-inflamatórios analisando:

Ação antiedematogênica sobre edema de pata induzido por carragenina;

Alterações histopatológicas do músculo plantar;

Atividade da enzima mieloperoxidase.

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

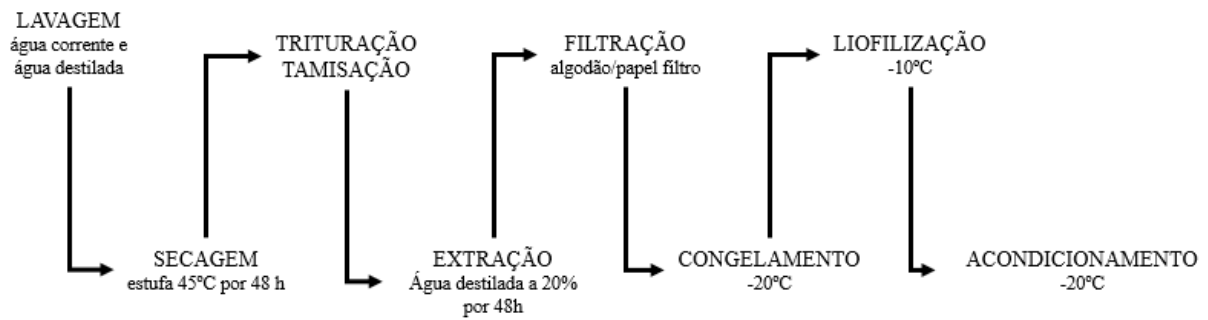
A espécie *Annona crassiflora* a partir da qual foram coletadas as folhas para a preparação do extrato aquoso, tendo sido previamente identificada por biólogo competente e uma exsicata da espécie depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia.

Neste estudo, as folhas da planta *Annona crassiflora* foram coletadas em campos de vegetação espontânea e transportadas para o Laboratório de Farmacologia para a preparação do extrato aquoso.

5.3 Obtenção do extrato aquoso

As folhas foram separadas dos galhos, lavadas em água corrente e, em seguida, em água destilada. Após esse procedimento, foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas para secagem. Depois de secas, foram trituradas em liquidificador e tamisadas. As folhas trituradas foram colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 20% (m/v) e submetidas a extração em 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, então, colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura - 20°C. Após 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 à - 20 °C até a data da utilização (Figura 2).

FIGURA 2 – Obtenção do extrato aquoso das folhas de *A. crassiflora*.



Fonte: autor.

5.4 Animais

Este projeto de pesquisa foi APROVADO pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, a qual regulamenta a pesquisa envolvendo animais (PROTOCOLO No.006/18– ANEXO A).

Foram utilizados 44 camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 15 e 30g. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia, onde foram mantidos até a data de realização dos experimentos, quando foram transportados para o biotério situado no bloco 2A, Campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais sempre foram acondicionados sob condições padrões em ambiente com temperatura controlada ($25 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração ad libitum. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA, 2016).

A administração por via oral de fármacos, veículos ou extrato aquoso de *A. crassiflora* aos animais foi realizada por meio de cânula de gavagem específica para camundongos (Figura 3), a qual foi introduzida na boca do animal e gentilmente conduzida até o estômago. O volume total administrado foi 1,0 mL / 100 g animal.

As injeções intraplantares (Figura 4) 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 medido até a articulação tíbio-társica em intervalos determinados após a injeção de CGN, com o auxílio de um pletismômetro (Figura 5) (VAN ARMAN et al., 1965).

FIGURA 3 – Gavagem.



Fonte: autor.

FIGURA 4 – Injeção intraplantar.



Fonte: autor.

FIGURA 5 – Pletismômetro.



Fonte: autor.

5.5 Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios

5.5.1 Edema de pata induzido por carragenina

A indução do processo inflamatório agudo ocasionado pela carragenina se dá rapidamente devido à ação de mediadores pró-inflamatórios que promovem hiperalnocicepção com aumento da sensibilidade a estímulos mecânicos, por exemplo, e se caracteriza pela formação do edema (MORRIS, 2003; FERREIRA et al., 2004). Sua ação após a injeção intraplantar, ocorre em três fases, de acordo com os mediadores envolvidos, onde a inicial é caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos relativos à precoce secreção de histamina e serotonina. Em uma fase intermediária, entre 1,5 e 2,5 horas após a administração de carragenina, a ação de cianinas leva a persistência no aumento da permeabilidade dos vasos, além de induzir a produção de prostaciclina atuantes no processo inflamatório. Após 2,5 horas da injeção, ocorre o pico máximo de seu efeito, devido à síntese de prostaglandinas no tecido inflamado, quando se torna possível avaliar grande infiltrado polimorfonuclear (UENO et al., 2000; CARVALHO, 2011; BATISTA et al., 2016).

A injeção intraplantar de carragenina é um modelo utilizado para investigar hiperalgesia inflamatória em camundongos e para este procedimento, por mais que esta metodologia tenha sido descrita em dados literários, tornou-se necessário a realização de uma padronização referente a melhor concentração de carragenina a ser administrada via injeção intraplantar para que se desencadeasse o efeito desejado nos procedimentos relacionados à avaliação anti-edematogênica do extrato aquoso de *Annona crassiflora*, bem como para se avaliar a cinética da formação do edema induzido e a ação da indometacina como agente anti-edematogênico escolhido para o controle positivo.

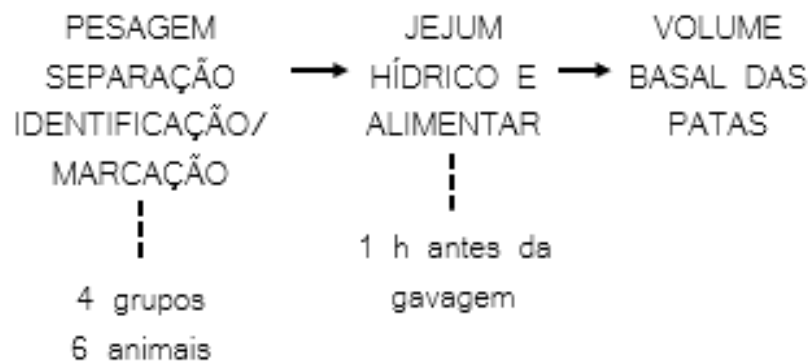
5.5.1.1 Padronização da concentração de carragenina

A indução do edema de pata foi realizada através de injeção intraplantar de 30 µL de carragenina (CGN; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,5% (5 mg CGN diluída em 1 mL de NaCl 0,9%) e 1% (10 mg CGN diluída em 1ml de NaCl 0,9% estéril) na pata posterior direita (CGN 0,5%, 30 µL correspondendo a 150 µg de CGN; CGN 0,5%, 30 µL correspondendo a 150 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).

Para se determinar a melhor concentração de CGN a ser administrada para indução do edema de pata, foram utilizados quatro grupos experimentais com seis animais ($n = 6$) em cada tratamento, levando a um total de 24 animais.

Na ocasião da padronização, os animais foram pesados, separados, identificados no rabo e marcados nas patas à altura da articulação tibiotársica. A média de peso do grupo foi utilizada para se calcular a dosagem de cada solução a ser administrada por via oral (1,0 ml/100 g animal) com o auxílio de cânula de gavagem. Uma hora antes da gavagem, os animais foram submetidos a jejum hídrico e alimentar e foi mensurado o volume basal de suas patas, por meio de um pletismômetro (Figura 5) (VAN ARMAN et al., 1965), que foi, posteriormente, comparado aos valores obtidos nos tempos 0,25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas após a injeção de carragenina, tornando-se possível avaliar a cinética de desenvolvimento do edema, que foi expresso como o aumento do volume (mL) da pata tratada com CGN (pata direita) subtraído do volume da pata controle negativo (pata esquerda), em cada intervalo de tempo (Figura 6).

FIGURA 6 – Preparação dos animais para os procedimentos.



Fonte: autor.

Para os diferentes tratamentos foram, então, utilizadas as seguintes soluções: carboximetilcelulose 0,5% solubilizada em água destilada (CBX; 1,0 ml/100 g animal) por via oral (v.o.); indometacina 0,5% solubilizada em carboximetilcelulose (10 mg/kg; 1,0 mL/100 g animal) por via oral (v.o.); carragenina 0,5% (CGN; 150 μ g; 30 μ L pata) solubilizada em NaCl 0,9% estéril por injeção intraplantar (i.p.); carragenina 1,0% (CGN; 300 μ g; 30 μ L pata) solubilizada em NaCl 0,9% estéril por injeção intraplantar (i.p.); NaCl 0,9% estéril (30 μ L pata) por injeção intraplantar (i.p.).

Em cada experimento, de acordo com o tratamento, os animais foram divididos em quatro grupos experimentais: Grupo 1A ($n=6$): animais tratados por via oral (v.o.) com CBX (1,0 mL/100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório); Grupo 1B ($n=6$): animais

tratados por via oral (v.o.) com CBX (1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório); Grupo 2A (n=6): 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). Grupo 2B (n=6): 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) (Figura 7). O fármaco padrão indometacina e solução de CBX 0,5% foram utilizados como controles positivo (KOSTER; ANDERSON; BEER, 1959) e negativo, respectivamente.

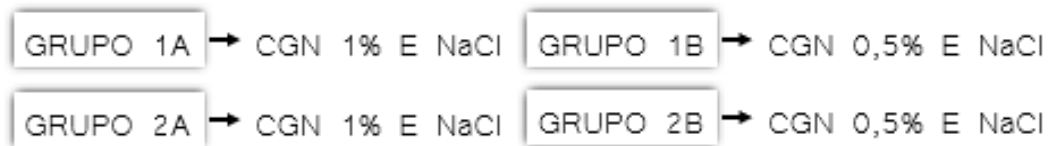
FIGURA 7 – Tratamentos por via oral.



Fonte: autor.

Sessenta minutos após os tratamentos por via oral, os grupos 1A e 2A receberam injeção intraplantar de CGN a 1,0% na pata posterior direita, enquanto os grupos 1B e 2B receberam injeção de CGN 0,5%. Como controle negativo do efeito induzido pela injeção de CGN, foi administrado igual volume de solução salina estéril (NaCl 0,9%) na pata posterior esquerda em todos os grupos experimentais (ALBERTINI et al., 2004; LIMA et al., 2010) (Figura 8).

FIGURA 8 – Tratamentos por via injeção intraplantar.



Fonte: autor.

5.5.1.2 Avaliação do efeito antiedematogênico de diferentes concentrações do extrato aquoso de *Annona crassiflora*

Foram utilizando cinco grupos experimentais com quatro animais (n = 4) em cada tratamento, levando a um total de 20 animais.

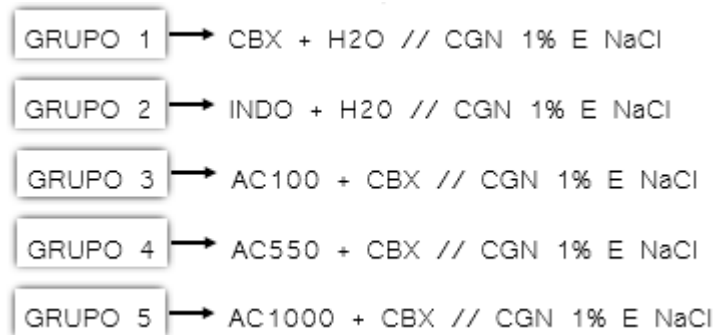
Na ocasião dos experimentos, como na padronização, os animais foram pesados, separados, identificados e marcados, submetidos a jejum hídrico e alimentar e foi mensurado o

volume basal de suas patas, posteriormente, comparado aos valores obtidos nos tempos 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas após a injeção de carragenina, e o edema foi, então, expresso como o aumento do volume (mL) da pata tratada com CGN (pata direita) subtraído do volume da pata controle negativo (pata esquerda), em cada intervalo de tempo.

Para os diferentes tratamentos foram, então, utilizadas as seguintes soluções: água destilada (1,0 ml/100 g animal); carboximetilcelulose 0,5% solubilizada em água destilada (CBX; 1,0 ml/100 g animal) por via oral (v.o.); indometacina 0,5% solubilizada em carboximetilcelulose (10 mg/kg; 1,0 mL/100 g animal) por via oral (v.o.); extrato de *Annona crassiflora* 100 mg/kg solubilizado em água destilada (AC100; 1,0 ml/100 g animal); extrato de *Annona crassiflora* 550 mg/kg solubilizado em água destilada (AC550; 1,0 ml/100 g animal); extrato de *Annona crassiflora* 1000 mg/kg solubilizado em água destilada (AC1000; 1,0 ml/100 g animal); carragenina 0,5% (150 µg; 30 µL pata) solubilizada em NaCl 0,9% estéril por injeção intraplantar (i.p.); carragenina 1,0% (CGN; 300 µg; 30 µL pata) solubilizada em NaCl 0,9% estéril por injeção intraplantar (i.p.); NaCl 0,9% estéril (30 µL pata) por injeção intraplantar (i.p.). 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 os tratamentos, os animais foram divididos em cinco grupos experimentais: Grupo 1 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com água destilada (1,0 mL/100 g animal) e CBX (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 AC100 (100 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e CBX (v.o., 1,0 mL/100 g animal); Grupo 4 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com AC550 (550 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e CBX (v.o., 1,0 mL/100 g animal); Grupo 5 (n = 4): animais tratados por via oral (v.o.) com AC1000 (1000 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) e CBX (v.o., 1,0 mL/100 g animal) (Figura 9). Sessenta minutos após os tratamentos por via oral, o edema de pata foi induzido por meio de injeção intraplantar de 30 µL de carragenina (CGN; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 1%; 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., 2010).

FIGURA 9 – Tratamentos por vias oral e injeção intraplantar.

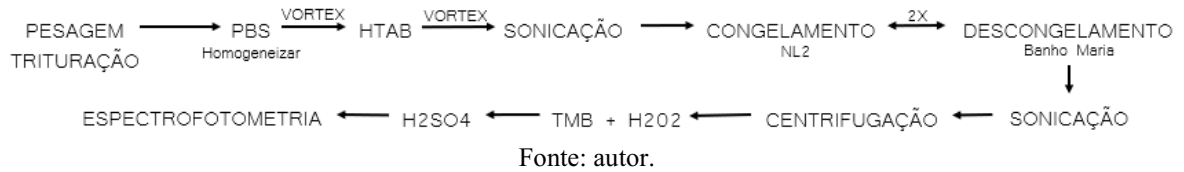


Fonte: autor.

5.5.2 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Para avaliação da atividade da mieloperoxidase, marcador quantitativo de neutrófilos utilizamos a técnica modificada 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 2700 g por 10 minutos a 4°C e os sobrenadantes utilizados para o 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% e 100 µL de TMB (3,3', 5,5'- tetrametilbenzidine - Sigma) a 6,4 mM diluído em DMSO (dimetil sulfóxido – Merck) concomitantemente; em seguida, essa mistura foi mantida a temperatura ambiente por 2 minutos cronometrados e, posteriormente, a reação foi finalizada com a adição de 100 µL de H₂SO₄ (ácido sulfúrico – Merck) 4 M. Em outro microtubo (eppendorf) foi preparado uma mistura de 300 µL de tampão fosfato pH 5,4 e 600 µL de HTAB (Brometo de Hexadeciltrimetilamônio – Sigma) 0,5% (p/v) diluído em tampão fosfato pH 5,4 para ser usado como fator de comparação com as amostras. Para a análise, foram adicionados 200 µL dessa mistura 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) (Figura 10).

FIGURA 10 – Processamento das amostras para avaliação da atividade da MPO.



5.5.3 Análise histopatológica

5.5.3.1 Padronização dos cortes histológicos

A análise histopatológica foi realizada com o objetivo de se avaliar o infiltrado inflamatório no músculo plantar das patas dos animais que receberam os diferentes tratamentos. Em busca do corte onde se observasse melhor conservação das fibras musculares, foi, então, realizada uma padronização para obtenção do melhor corte histológico em diferentes preparações para o processamento das lâminas.

Logo após a última medida do edema podal, os animais foram eutanasiados e as patas foram seccionadas na região do maléolo (articulação tibiotársica) e processadas para avaliação do músculo plantar por microscopia de luz.

Para a padronização do material a ser avaliado, foram utilizados quatro diferentes cortes: pata íntegra, pata sem os dedos, pata sem os dedos e com secção longitudinal e coxim plantar isolado. Na preparação da pata íntegra, utilizou-se fixação em formalina 10% por mais de 48 horas e, devido grande quantidade de tecido ósseo na amostra, optou-se por associar à preparação das peças seguintes, a desmineralização com ácido fórmico 10% por 48 horas imediatamente antes do processamento histológico (Figura 11).

FIGURA 11 – Padronização dos cortes histológicos.



Fonte: autor.

5.5.3.2 Análise histopatológica

Após a preparação, as peças foram identificadas e acondicionadas em cassetes, desidratadas em concentrações crescentes de álcool, diafanizadas em xilol, embebidas em parafina e, finalmente, incluídas em blocos cúbicos de parafina (Tabela 1). Foram, então, realizados cortes de 5 µm de espessura, com auxílio de micrótomo manual, e os mesmos foram utilizados para a preparação de lâminas para coloração com a técnica hematoxilina/eosina (Tabela 2) e avaliação em microscópio de luz quanto aos escores de inflamação analisados por campo.

TABELA 1 – Técnica de inclusão em parafina.

Reagente	Tempo
Colocar numa frigideira a quantidade necessária de parafina para derreter na estufa 70 °C;	
ÁLCOOL 70 %	1 hora
ÁLCOOL 85 %	30 minutos
ÁLCOOL 95 %	30 minutos
ÁLCOOL 100 % I	30 minutos
ÁLCOOL 100 % II	30 minutos
ÁLCOOL 100 % III	30 minutos
Tirar o excesso de álcool com papel toalha;	
XILOL I	30 minutos
XILOL II	30 minutos
XILOL III	30 minutos
Tirar o excesso de xilol com papel toalha;	
PARAFINA I (estufa 70 °C)	30 minutos
PARAFINA II (estufa 70 °C)	30 minutos
PARAFINA III (estufa 70 °C)	30 minutos

Ligar a resistência 15 minutos antes de retirar os cassetes da parafina III;

Retirar a frigideira com a parafina derretida e os cassetes da estufa;

Colocar os cassetes mergulhados na parafina sobre a resistência enquanto são manipulados;

Encher as formas de parafina e organizar as peças conforme os cortes de interesse;

Deixar secar por 12 horas.

Fonte: laboratório de histologia humana do ICBIM/UFU.

TABELA 2 – Técnica de coloração hematoxilina e eosina.

Substância	Tempo
XILOL III	15 minutos
XILOL II	15 minutos
XILOL I	15 minutos
Tirar o excesso de xilol com papel toalha;	
ÁLCOOL ABSOLUTO III	1 minuto
ÁLCOOL ABSOLUTO II	1 minuto
ÁLCOOL ABSOLUTO I	1 minuto
ÁLCOOL 95 %	1 minuto
ÁLCOOL 85 %	1 minuto
ÁLCOOL 70 %	1 minuto
ÁGUA CORRENTE	10 minutos
ÁGUA DESTILADA	5 minutos
Tirar o excesso de água destilada com papel toalha;	
Filtrar Hematoxilina de Harris;	
HEMATOXILINA DE HARRIS	50 segundos
ÁGUA CORRENTE	10 minutos

ÁGUA DESTILADA	5 minutos
Tirar o excesso de água destilada com papel toalha;	
EOSINA FLOXINA	2 minutos
ÁGUA CORRENTE	4 mergulhadas
Tirar o excesso de água com papel toalha;	
ÁLCOOL 70 %	10 mergulhadas
ÁLCOOL 85 %	10 mergulhadas
ÁLCOOL 95 %	10 mergulhadas
ÁLCOOL ABSOLUTO I	10 mergulhadas
ÁLCOOL ABSOLUTO II	10 mergulhadas
ÁLCOOL ABSOLUTO III	10 mergulhadas
Tirar o excesso de álcool com papel toalha;	
XILOL I	10 minutos
XILOL II	10 minutos
XILOL III	10 minutos
Colar lamínula com Goma de Damar.	

Fonte: laboratório de histologia humana do ICBIM/UFU.

5.6 Protocolo de eutanásia

Os animais foram mortos por deslocamento cervical sem anestesia prévia. Este procedimento é aceito pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal para pequenos animais, incluindo aves pequenas e roedores com menos de 200 gramas (CONCEA, 2016).

5.7 Análise Estatística

Para todos os cálculos estatísticos, nos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, 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 \pm 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 exibem distribuição normal. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

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

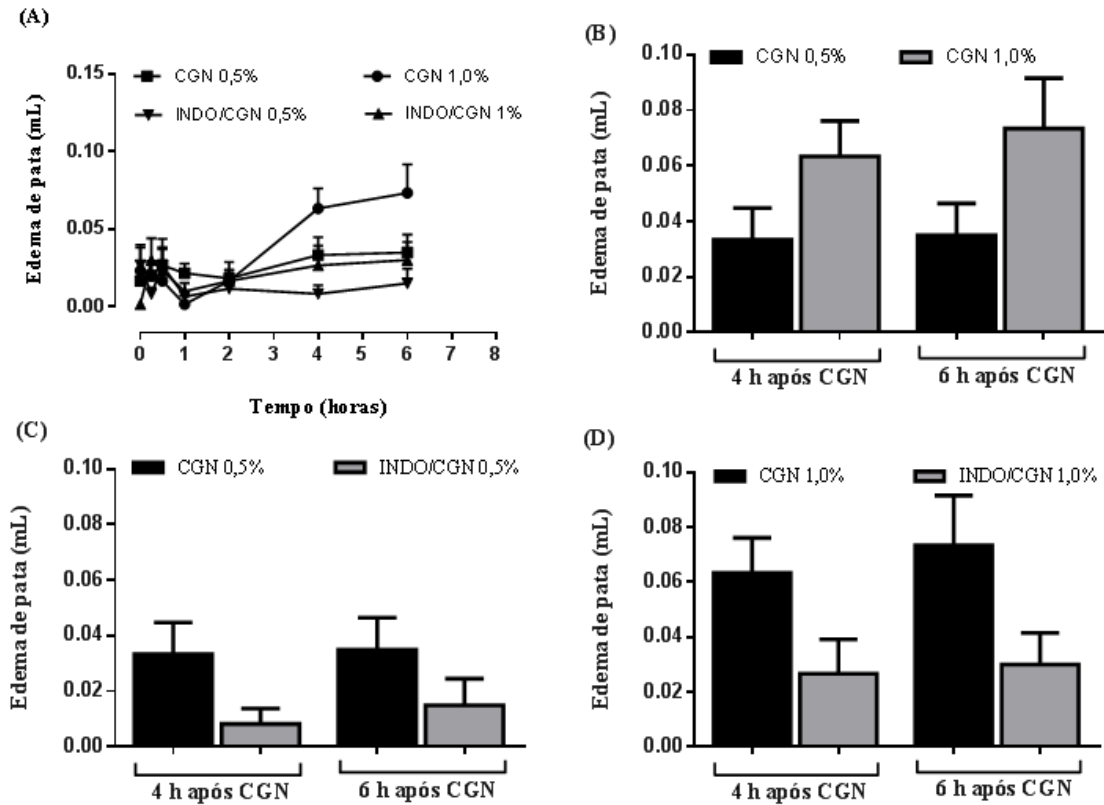
Os resultados obtidos mostram que (1) o edema de pata em camundongos Balb/c foi induzido em ambas as concentrações de carragenina (0,5 e 1,0 % em NaCl) utilizadas, sendo mais evidente na concentração de 1%; (2) o edema de pata induzido por carragenina (0,5 e 1,0 %) foi mais evidente após 4 e 6 horas 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 ambas as concentrações de carragenina utilizadas (0,5 e 1,0 %) (4) o edema evidenciado nas primeiras aferições (15 e 30 minutos), sugere-se não ser de origem inflamatória e sim do processo de absorção das substâncias administradas por via intraplantar . Considerando os resultados obtidos no ensaio de e padronização, padronizou-se a utilização de carragenina 1% para a avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *Annona crassiflora* (Gráfico 1).

6.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso da *Annona crassiflora*

Os resultados obtidos na avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico em camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina 1,0%, mostram que anti-inflamatório não esteroide indometacina reduziu o edema de pata na dose utilizada (10 mg/Kg), onstituindo um controle positivo para ação anti-inflamatória eficaz no modelo de estudo utilizado (Gráfico 2).

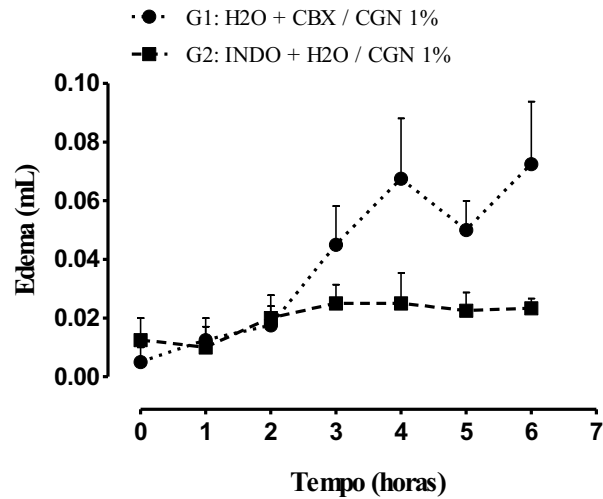
O extrato aquoso da *Annona crassiflora*, em todas as concentrações utilizadas (100, 550, 1000 mg/kg), não reduziu o edema de pata induzido por carragenina, de modo estatisticamente significativo. Entretanto, na concentração igual a 550 mg/Kg, houve uma tendência à redução do edema nos tempos 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (Gráfico 3).

GRÁFICO 1 - Padronização do método de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c.



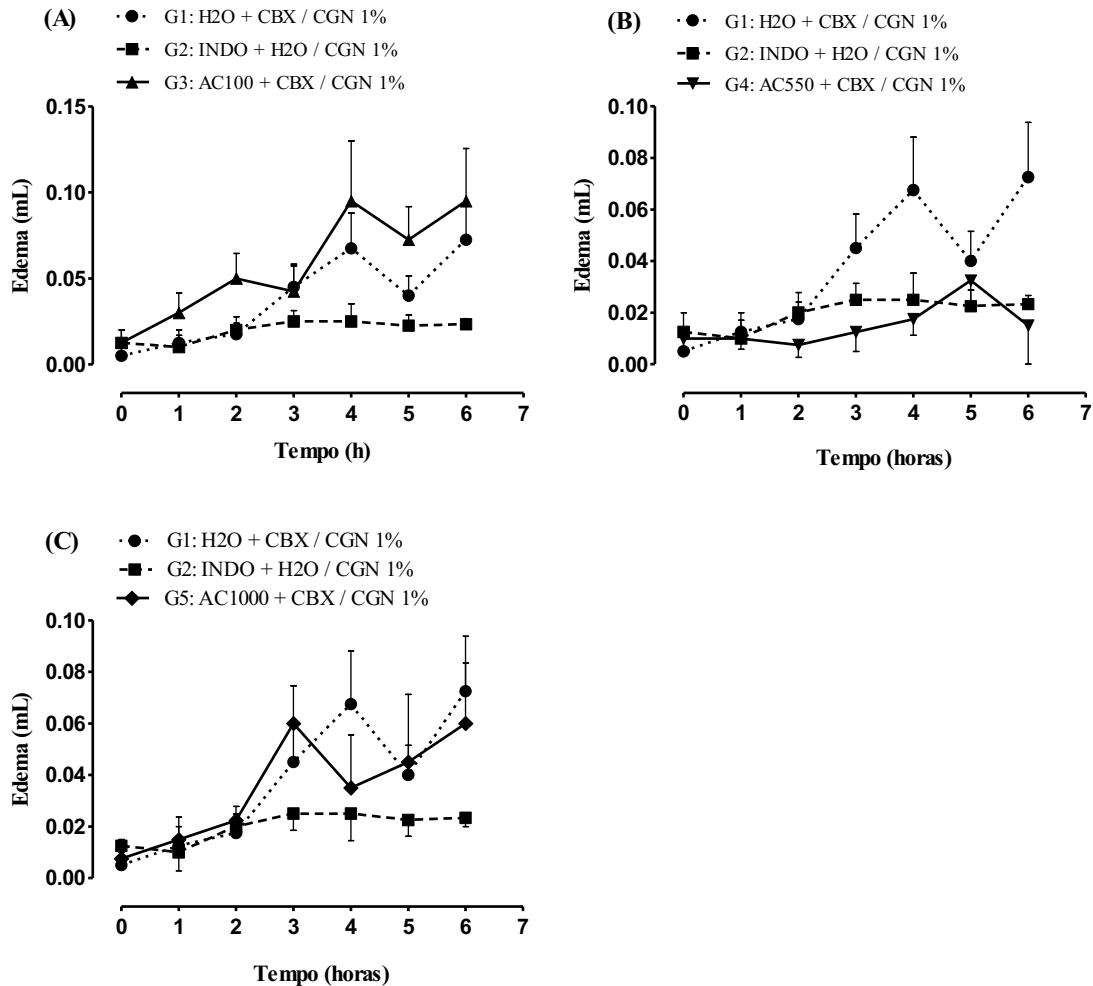
(A) Avaliação tempo-dependente do edema de pata em animais tratados por via oral com: indometacina (INDO; 10 mg/Kg; veículo: carboximetilcelulose; controle positivo) ou apenas carboximetilcelulose (CBX) (controle negativo); e, após 1 hora, tratados com CGN (0,5% ou 1%) por via intraplantar. (B) Avaliação do edema de pata após 4 e 6 horas da 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 dois experimentos independentes, realizados em triplicatas.

GRÁFICO 2 - Avaliação do efeito antiedematogênico 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 um experimento, realizado em quadruplicata

GRÁFICO 3: Avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *Annona crassiflora*.

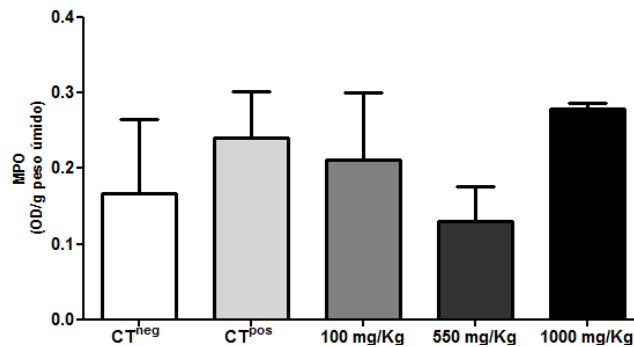


Avaliação do efeito antiedematogênico de diferentes concentrações do extrato aquoso da *Annona crassiflora* (AC; 100, 550, 1000 mg/Kg) administradas por via oral, em edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (CGN) 1,0% em camundongos da linhagem BALB/c. Dados representativos de um experimento, realizado em quadruplicata.

6.3 Avaliação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Não houve diferença estatisticamente significativa na atividade da enzima mieloperoxidase entre os diferentes grupos tratados com carboximetilcelulose (0,5%), indometacina e extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora* nas concentrações 100, 550 e 1000 mg/Kg (Gráfico 4).

GRÁFICO 4 – Avaliação da atividade da MPO.

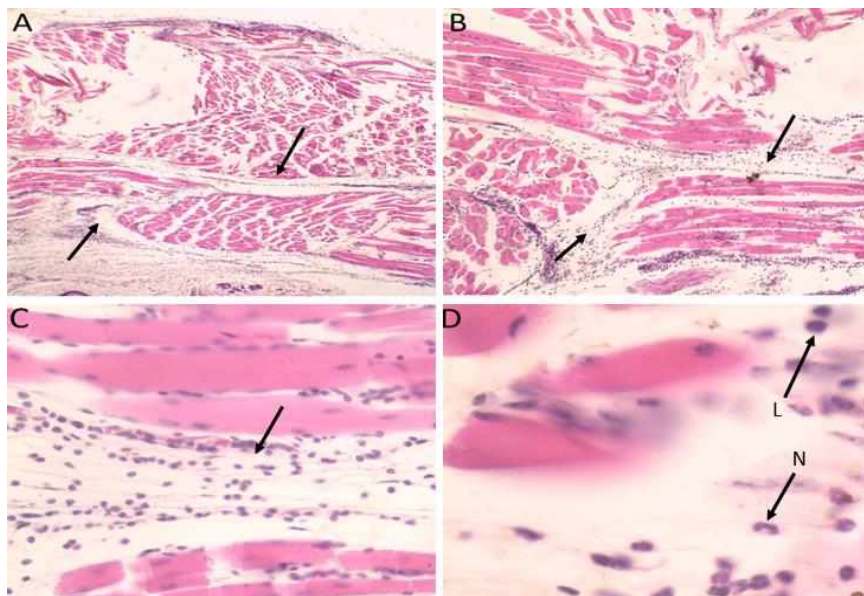


Avaliação do efeito anti-inflamatório de diferentes concentrações do extrato aquoso da *Annona crassiflora* (AC; 100, 550, 1000 mg/Kg) administradas por via oral, em atividade da enzima mieloperoxidase em edema de pata induzido por injeção intraplantar de carragenina (CGN) 1,0% em camundongos da linhagem BALB/c. Dados representativos de um experimento, realizado em quadruplicata.

6.4 Padronização para análise histopatológica

Para análise histopatológica do tecido plantar na intenção de se caracterizar situações de infiltrado inflamatório (Figura 12), foram retiradas as patas posteriores direita (CGN 0,5%) e esquerda (NaCl 0,9%) dos animais dos diferentes grupos experimentais na altura do maléolo e, posteriormente, acondicionadas em formol 10% para fixação dos tecidos até a situação de processamento das peças para avaliação. Devido a presença de material ósseo, somente a fixação em formol não foi suficiente para a confecção de cortes representativos do material. Com o objetivo de se avaliar o infiltrado inflamatório no músculo plantar, padronizou-se seccionar as patas a altura da articulação tibiotársica logo após a eutanásia dos animais, retirando todos os dedos, fixar as peças em formalina 10 % por, pelo menos, 48 horas, desmineralizar em ácido fórmico 10 % por 48 horas, lavar quatro vezes em solução tampão, cortar as peças isolando-se o coxim plantar e seguir o processamento histológico com desidratação em álcool, diafanização em xilol, inclusão em parafina e coloração por Hematoxilina e Eosina.

FIGURA 12 – Cortes histológicos do músculo plantar de animais tratados com carboximetilcelulose (0,5%; v.o.) e injeção intraplantar de carragenina 0,5%.



Fonte: autor.

(A) aumento de 4x; (B) aumento de 10x. Nos cortes longitudinal e transversal, observa-se feixes de fibras musculares cilíndricas, multinucleadas, com núcleo periférico e presença de infiltrado inflamatório (setas pretas); (C) aumento de 40x; (D) aumento 100x. Observa-se infiltrado neutrofilico (seta N) e linfocitário (seta L), com predominância de polimorfonucleares.

7 DISCUSSÃO

Diversos estudos tem utilizado o edema de pata induzido por carragenina como método de avaliação da ação antiedematogênica/anti-inflamatória de diferentes substâncias (ROCHA et al., 2015; VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ et al., 2014). Neste trabalho, a carragenina se comportou como agente edematogênico em ambas concentrações analisadas, o que se encontra de acordo com estudos anteriores (MORRIS, 2003; FERREIRA et al., 2004; UENO et al., 2000; CARVALHO, 2011; BATISTA et al., 2016).

Da mesma forma, a indometacina, utilizada como controle positivo para efeito anti-inflamatório, teve eficácia na redução do edema induzido por carragenina, corroborando com suas citações literárias (DUTRA et al., 2006).

No entanto, o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* não apresentou atividade antiedematogênica com significância estatística, mesmo apresentando tendência na redução do edema em concentração de 550 mg/Kg. Esse resultado não se apresenta em conformidade com trabalhos anteriores, cujos modelos experimentais utilizaram camundongos Swiss com edema de pata induzido por CGN 0,6% e o extrato metanoico das folhas de *Annona crassiflora* se apresentou com eficaz atividade anti-inflamatória na redução do edema referenciado (ROCHA et al., 2015).

Vários fatores podem ter influenciado para a ausência de diferença estatística significativa na redução do edema induzido por carragenina entre os grupos experimentais, tratados com as diferentes concentrações do extrato, e os grupos controles negativo e positivo, tratados com veículo e indometacina, respectivamente. Entre estes fatores podemos citar a ausência de efeito antiedematogênico no uso por via oral do extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora*, nunca antes descrito, para o tratamento de injúrias agudas e a grande variabilidade interindividual dos efeitos nos animais, que nos leva a inferenciar que houve um pequeno número amostral.

8 CONCLUSÃO

Conclui-se, ao fim do presente trabalho, que o extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora* não apresentou atividade antiedematogênica no modelo experimental *in vivo*, onde se utilizou camundongos BALB/c machos.

Sugere-se, então, reavaliar a atividade antiedematogênica do extrato aquoso das folhas de *Annona crassiflora* em grupo amostral maior.

REFERÊNCIAS

- ALBERTINI, R. et al. **Effects of different protocol doses of low power gallium–aluminum–arsenate (Ga–Al–As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema.** Journal of photochemistry and photobiology, v. 74, p. 101-107, May. 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.; RAMOS, M. A.; MELO, J.G. **New strategies for drug discovery in tropical forests based on ethnobotanical and chemical ecological studies.** Journal of Ethnopharmacology, v. 140, n. 1, p. 197-201, Dec. 2012.
- ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis.** Planaltina, Embrapa-CPAC, p. 464, 1998.
- ARRUDA, H. S. et al. **Determination of free, esterified, glycosylated and insoluble-bound phenolics composition in the edible part of araticum fruit *Annona crassiflora* Mart. and its by-products by HPLC-ESI-MS/MS.** Food Chemistry, Elsevier, v. 245, p. 738-749, Dec. 2017.
- ARRUDA, H. S. et al. **Effects of high-intensity ultrasound process parameters on the phenolic compounds recovery from araticum peel.** Ultrasonics Sonochemistry, Elsevier, Sep. 2018.
- BATISTA, E. K. et al. **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016.
- BRADLEY, P. P. et al. **Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker.** Journal of Investigative Dermatology, v. 78, p. 206-209, 1982.
- BEUCHLE, R. et al. **Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach.** Applied Geography, v. 58, p. 116-127, Mar. 2015.
- BRASIL. Instituto Butantã. **Serpentes Peçonhentas.** São Paulo, SP, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos.** Brasília, p. 190, 2016.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Centro-Oeste.** Rio de Janeiro, 2016.
- CALIXTO, J. B. et. al. **Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs.** Expert Opinion Emerging Drugs. v. 6, n. 2, p. 261-279, 2001.
- CAMPELO, L. **Cerrado perde metade da vegetação nativa; agronegócio acelera o processo.** Brasil de fato. São Paulo, Feb. 2017.

CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da riparina II (o-metil-n-2- hidroxibenzoil tiramina) em modelos experimentais.** Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CONCEA. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. **Diretrizes de Integridade e de Boas Práticas para Produção, Manutenção ou Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou Pesquisa Científica.** 1ª ed. São Paulo, MCTIC, 2016.

DE OMENA, M. et al. **Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants.** Bioresource Technology, São Paulo, v. 98, n. 13, p. 2549-2556, Sep. 2007.

DUTRA, R. C. et al. **Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.

FANK-DE-CARVALHO, S. M. et al. **Plant structure in the Brazilian neotropical savannah species.** Biodiversity in Ecosystems - Linking Structure and Function. Croatia, p. 425-459, Apr. 2015.

FERRAZ, C. R. et al. **Antidiarrhoeic effect and dereplication of the aqueous extract of *Annona crassiflora* (Annonaceae).** Natural Product Research, p. 1-5, Oct. 2017.

FERREIRA, M. A. D. et al. **Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone a isolated from *Auxemma oncocalyx*.** Phytomedicine, v. 11, n. 4, p. 315-322, 2004.

FORMAGIO, A. S. N. et al. **In vitro biological screening of the anticholinesterase and antiproliferative activities of medicinal plants belonging to Annonaceae.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 308-315, Apr. 2015.

HOMANN, A. G. **Spinal and peripheral mechanisms of cannabinoid antinociception: behavioural, neurophysiological and neuroanatomical perspectives.** Chemistry and Physics of Lipids, v. 121, n. 1 – 2, p. 173-190, Dec. 2002.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução a taxonomia vegetal.** 2.ed. Edusp, São Paulo, p. 777, 1975.

JUSTINO, A. B. et al. **Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, São Paulo, v. 65, n. 22, p. 4428-4438, May. 2017.

JUSTINO, A. B. et al. **Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities.** Bioorganic Chemistry, v. 69, p. 167-182, Dec. 2016.

KAUR, R.; SINGH, D.; CHOPRA, K. **Participation of alpha (2) receptors in the antinociceptive activity of quercetin.** Journal of Medicinal Food, v. 8, n. 4, p. 529-532, Aug. 2005.

- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. **Acetic acid for analgesic screening.** Federation Proceedings, v. 18, p. 412, 1959.
- LAGE, G. A. et al. **The first report on flavonoid isolation from *Annona crassiflora* Mart.** Natural Product Research, v. 28, n. 11, p. 808-811, Feb. 2014.
- LEBOEUF, M. et al. **The phytochemistry of the Annonaceae.** Phytochemistry, v. 21, n. 12, p. 2783-2813, 1982.
- LIMA, T. B. et al. **Identification of *E. dysenterica* laxative peptide: a novel strategy in the treatment of chronic constipation and irritable bowel syndrome.** Peptides, v. 31, p. 1426-1433, 2010.
- LI, W. et al. **Biological activity evaluation and structure-activity relationships analysis of ferulic acid and caffeic acid derivatives for anticancer.** Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters, v. 22, n. 19, p. 6085-6088, Oct. 2012.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.** 2.ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa, v. 2, 1998.
- MACHADO, A. R. T. et al. **Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*.** Parasites & Vectors, v. 8, n. 1, p. 113, Feb. 2015.
- MESQUITA, M. et al. **Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 100, n. 7, p. 783-787, Nov. 2005.
- MESQUITA, M. L. et al. **Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines.** Journal of Ethnopharmacology, v. 123, n. 3, p. 439-445, Mar. 2009.
- MORRIS, C. J. **Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse.** Inflammation Protocols, p. 115–122, 2003.
- MYERS, N. et al. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature, v. 403, n. 6772, p. 853-858, Feb. 2000.
- NAIDU, P. S.; SINGH, A.; KULKARNI, S. K. **D2-dopamine receptor and alpha2-adrenoreceptor-mediated analgesic response of quercetin.** Indian Journal of Experimental Biology, v. 41, n. 12, p. 1400-1404, Dec. 2003.
- OLIVEIRA, C. C. et al. **Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice.** Inflammopharmacology, 2018.
- OLIVEIRA, C. D. et al. **Peltatoside Isolated from *Annona crassiflora* Induces Peripheral Antinociception by Activation of the Cannabinoid System.** Planta Med, v. 83, n. 3-4, p. 261-267, Feb. 2016.

- PIMENTA, L. P. et al. **In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart.** Natural Product Research, São Paulo, v. 28, n. 16, p. 1254-1259, Mar. 2014.
- RIBEIRO, I. C. O. et al. **Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus* spp. and *Escherichia coli* from cattle.** BMC Veterinary Research, v. 14, n. 1, 2018.
- ROCHA, R. S. et al. **Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract.** Pharmaceutical Biology. São Paulo, v. 54, n. 1, p. 35-47, Apr. 2015.
- ROESLER, R. et al. **Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: Characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry.** Food Chemistry, v. 104, n. 3, p. 1048-1054, 2007.
- ROESLER, R. et al. **Antioxidant activity of cerrado fruits.** Food Science and Technology, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, Mar. 2007.
- ROESLER, R. et al. **Evaluation of the antioxidant properties of the Brazilian Cerrado fruit *Annona crassiflora* (Araticum).** Journal of Food Science, v. 71, n. 2, p. 102-107, Mar. 2006.
- SANO, E. E. et al. **Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil.** Environmental Monitoring and Assessment, v. 166, n 1-4, p. 113-124, Jul. 2010.
- SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. **Molluscicidal properties of some species of *Annona*.** Phytomedicine, São Paulo, v. 8, n. 2, p. 115-120, Mar. 2001.
- SHRINIVASAN, M. et al. **Homology modelling of CB1 receptor and selection of potential inhibitor against obesity.** Bioinformation, v. 8, n. 11, p. 523-528, Jun. 2012.
- SILVA JUNIOR, J. et al. **In vitro screening antibacterial activity of *bidens pilosa* linné and *Annona crassiflora* mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (orsa) from aerial environment at the dental clinic.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 56, n. 4, p. 333-340, Aug. 2014.
- SILVA, V. A. O. et al. **Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines.** Investigational New Drugs. Aug. 2018.
- SUN, Q.; HEILMANN, J.; KONIG, B. **Natural phenolic metabolites with anti-angiogenic propertie - A review from the chemical point of view.** Beilstein Journal of Organic Chemistry, v. 11, p. 249-264, Feb. 2015.
- SZWAJGIER, D.; BOROWIEC, K. **Phenolic acids from malt are efficient acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors.** Journal of the Institute of Brewing, v. 118, n. 1, p. 40-48, May. 2012.

UENO, A. et al. **Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin**: a study on the paw edema induced in ip-receptor-deficient mice. *Life Science*, v. 66, n. 12, p.155-160, 2000.

VAN ARMAN, C. G. et al. **Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan**. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 150, p. 328-334, 1965.

VELÁZQUES-GONZÁLEZ, C. et al. **Antinociceptive and anti-inflammatory activities of Geranium bellum and its isolated compounds**. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, v. 14, n. 1, 2014.

VIEIRA, R. F. et al. **Frutas Nativas da Região Centro-Oeste do Brasil**. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, 2006.

VILAR, J. B. et al. **Assessment of the mutagenic, Antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (Annona crassiflora Mart. 1841) by micronucleus test in mice**. *Brazilian Journal of Biology*, São Carlos, v. 68, n. 1, p. 141-147, Feb. 2008.

VIOLANTE, I. M. et al. **Antimicrobial activity of some medicinal plants from the Cerrado of the central western region of Brazil**. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 43, n. 4, p. 1302-1308, Dec. 2012.

WEINBERG, M. L. et al. **Inhibition of drug-induced contractions of guinea-pig ileum by Annona crassiflora seed extract**. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, São Paulo, v. 45, n. 1, p. 70 – 72, Jan. 1993.

WILLAIN FILHO, A. et al. **Quercetin: fur ther investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action**. *Archives of Pharmacal Research*, v. 31, n. 6, p. 713-721, Jun. 2008.

ANEXO A - Protocolo No.006/18 Aprovação do projeto de pesquisa pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Uberlândia, a qual regulamenta a pesquisa envolvendo animais.



Universidade Federal de Uberlândia
Pro-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 093/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 00618

Projeto Pesquisa: “Estudo da Atividade Farmacológica Anti-inflamatória do Extrato de *Annona crassiflora* (Araticum) 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, 11 de junho de 2018.

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