

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**JÉSSICA NOGUEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA  
*Annona crassiflora* (ARATICUM) DC EM MODELOS EXPERIMENTAIS *in vivo* e *in*  
*vitro***

**UBERLÂNDIA, MG**

**2019**

**JÉSSICA NOGUEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA  
*Annona crassiflora* (ARATICUM) DC EM MODELOS EXPERIMENTAIS *in vivo* e *in*  
*vitro*.**

**Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado à Faculdade de Medicina  
Veterinária, Curso de Graduação em  
Medicina Veterinária, da Universidade  
Federal de Uberlândia, como requisito para  
aprovação na disciplina de Trabalho de  
Conclusão de Curso II (TCC 2, código:  
GMV048).**

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

**UBERLÂNDIA, MG**

**2019**

**JÉSSICA NOGUEIRA SILVA**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA  
*Annona crassiflora* (ARATICUM) DC EM MODELOS EXPERIMENTAIS *in vivo* e *in*  
*vitro*.**

**Trabalho de Conclusão de Curso aprovado  
para a obtenção do título de Bacharel em  
Medicina Veterinária pela Universidade  
Federal de Uberlândia (MG) pela banca  
examinadora formada por:**

**Uberlândia, 06 de dezembro de 2019.**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Celene Maria de Oliveira Simões Alves, UFU/MG**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Alessandra Aparecida Medeiros-Rochi, UFU/MG**

---

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Roberta Campos Lino, UFTM/MG**

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus por tudo. À minha mãe, Valéria Aparecida Pimenta Nogueira, por sempre estar presente, acreditar em mim e por ser meu exemplo em tudo, palavras não conseguem descrever tamanho amor e admiração. Aos meus familiares Iraci Nogueira, Agenor Soares, Edméia Nogueira e Natanael Gomide que mesmo estando longe, sei que sempre posso contar. À minha família em Uberlândia, Gislene Machado, Aparecido Fernandes e Sandro Fernandes, por estarem presente e sempre se preocuparem comigo. Aos meus amigos por estarem comigo durante a faculdade e me ajudar sempre que preciso, em especial à Juliana Macedo que esteve comigo durante parte da execução deste projeto. À minha orientadora Celene, à qual tenho enorme carinho, por me orientar. À minha professora Alessandra Medeiros, à qual aceitou fazer parte da minha banca e tenho enorme carinho. Às técnicas Danielle e Taís que estiveram comigo nos experimentos, ensinando e fornecendo materiais, vocês foram essenciais para a execução do presente estudo.

Agradeço à Pró-reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação (PROPP) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) por possibilitar o desenvolvimento da pesquisa realizada e de tantas outras. Ao REBIR por fornecer os animais e local de qualidade para que os experimentos fossem realizados.

## RESUMO

O Cerrado brasileiro apresenta inúmeras espécies de uso popular, incluindo a *Annona crassiflora* (AC) da família Annonaceae. Compostos bioativos, tais como flavonoides, taninos e alcaloides foram identificados em extratos das folhas, sementes, casca e frutos da *A. crassiflora*, os quais foram associados às atividades bactericida, antimalárica, larvicida, nematicida, anti-Leishmania, analgésica e anti-inflamatória. Contudo, não há na literatura estudos que avaliaram o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas da referida espécie. Desse modo, o presente estudo teve como objetivo geral investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso liofilizado das folhas da *A. crassiflora* (EAAC) utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, de inflamação peritoneal induzida por carragenina (CGN) e quantificação da produção de óxido nítrico (NO) em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7, respectivamente. No modelo experimental *in vivo*, camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos (G 1 – 4) e tratados por via oral (v.o.) com: G1=carboximetilcelulose (CBX) 0,5%; G3=EAAC 30 mg/Kg; G4=EAAC 55 mg/Kg; G5=EAAC 100 mg/Kg. Após sessenta minutos, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de CGN 1% para indução da inflamação peritoneal. Quatro horas após a injeção de CGN, os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita uma incisão no abdômen e a cavidade peritoneal foi gentilmente lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS), pH 7,2, e o lavado peritoneal foi coletado para as contagens total e diferencial de leucócitos. Os resultados obtidos demonstraram que o EAAC, na dose de 30 mg/Kg, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal, comparado ao grupo controle tratado apenas com o veículo CBX 0,5%. Além disto, nessa dose, houve redução da população de mononucleares (monócitos/macrófagos), mas não de neutrófilos e linfócitos, como observado na contagem diferencial. Nas maiores doses (55 e 100 mg/Kg), o EAAC reduziu as populações de neutrófilos e monócitos/macrófagos, embora não tenha diminuído a migração leucocitária total, em relação ao grupo controle. Considerando que o EAAC (30 mg/Kg) reduziu o número de monócitos/macrófagos na resposta inflamatória peritoneal induzida por CGN 1%, investigamos o seu efeito sobre a produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7. Células RAW 264.7 foram tratadas com meio RPMI somente (controle) ou com diferentes concentrações do EAAC (0,488 a 1000,0 µg/mL) por 24 horas e, em seguida, a produção de NO foi quantificada nos sobrenadantes de cultura por meio do método de Griess. Os resultados obtidos sugerem que o extrato, nas maiores concentrações (62 a 1000 µg/mL), tende a induzir a produção de NO de modo dose-dependente, como

demonstrado pela maior quantidade de NO determinada em sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7, embora não foram observadas diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle. Os resultados obtidos sugerem que o EAAC possui propriedades anti- ou pró- inflamatórias dose-dependentes, apresentando, portanto, um efeito dual na modulação de respostas inflamatórias.

**Palavras chave:** *Annona crassiflora*. Inflamação peritoneal. Óxido nítrico. Células RAW 264.7.

## ABSTRACT

The Brazilian Cerrado has numerous species of popular use, including *Annona crassiflora* (AC) from the Annonaceae family. Bioactive compounds such as flavonoids, tannins and alkaloids were identified in extracts of leaves, seeds, bark and fruits of *A. crassiflora*, which have been associated with bactericidal, antimalarial, larvicidal, nematocidal, anti-Leishmanial, analgesic and anti-inflammatory activities. However, there are no studies in the literature that evaluated the anti-inflammatory potential of the aqueous extract of the leaves of this species. Thus, the present study aimed to investigate the possible anti-inflammatory effects of the freeze-dried aqueous extract of *A. crassiflora* leaves (EAAC) using *in vivo* and *in vitro* experimental models, of peritoneal inflammation induced by carrageenan (CGN) and quantification the production of nitric oxide (NO) in culture supernatants of RAW 264.7 cells, respectively. In the *in vivo* experimental model, BALB/c mice were divided into four groups (G 1 - 4) and treated orally (p.o.) with: G1 = 0.5% carboxymethyl cellulose (CBX); G3 = EAAC 30 mg / kg; G4 = EAAC 55 mg / kg; G5 = EAAC 100 mg / kg. After sixty minutes, the animals received an intraperitoneal (i.p.) injection of 1% CGN to induce peritoneal inflammation. Four hours after the CGN injection, the animals were anesthetized and killed by cervical dislocation. Then, an incision was made in the abdomen and the peritoneal cavity was gently washed with phosphate buffered saline (PBS), pH 7.2, and the peritoneal lavage was collected for total and differential leukocyte counts. The results obtained showed that EAAC, at a dose of 30 mg / kg, significantly reduced the migration of total leukocytes to the peritoneal cavity, compared to the control group treated only with the 0.5% CBX vehicle. In addition, at this dose, there was a reduction in the population of mononuclear cells (monocytes / macrophages), but not of neutrophils and lymphocytes, as observed in the differential count. In the highest doses (55 and 100 mg / kg), EAAC reduced the populations of neutrophils and monocytes / macrophages, although it did not decrease the total leukocyte migration, in relation to the control group. Considering that EAAC (30 mg / kg) reduced the number of monocytes / macrophages in the peritoneal inflammatory response induced by CGN 1%, we investigated its effect on the production of nitric oxide (NO) in RAW 264.7 cells. RAW 264.7 cells were treated with RPMI medium only (control) or with different concentrations of EAAC (0.488 to 1000.0 µg / mL) for 24 hours, and then NO production was quantified in culture supernatants using the method of Griess. The results obtained suggest that the extract, in its highest concentrations (62 to 1000 µg / mL), tends to induce NO production in a dose-dependent manner, as demonstrated by the greater amount of NO determined in supernatants of the cultures of RAW 264.7 cells, although there

were no statistically significant differences in relation to the control group. The results obtained suggest that the EAAC has dose-dependent anti- or pro-inflammatory properties, thus presenting a dual effect on the modulation of inflammatory responses.

**Key words:** *Annona crassiflora*. Peritoneal inflammation. Nitric oxide. *Macrophage-like*. RAW 264.7.



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>12</b>
2.1 <i>Annona crassiflora</i> .....	12
2.2 Atividades biológicas .....	12
2.3 Inflamação, células e mediadores inflamatórios .....	14
2.4 Óxido Nítrico (NO) .....	15
2.5 Drogas anti-inflamatórias .....	16
2.6 Modelos experimentais para avaliar potencial anti-inflamatório de novas substâncias .....	17
2.7 Linhagem celular <i>macrophage-like</i> RAW 264.7 .....	18
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>20</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>21</b>
4.1 Objetivo geral .....	21
4.2 Objetivos específicos .....	21
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	<b>22</b>
5.1 Material vegetal .....	22
5.2 Obtenção do extrato aquoso .....	22
5.3 Modelo experimental <i>in vivo</i> .....	23
5.3.1 Local de execução .....	23
5.3.2 Animais .....	23
5.3.3 Padronização do tempo para indução da inflamação peritoneal induzida por carragenina (CGN).....	23
5.3.4 Indução da inflamação peritoneal por carragenina.....	24
5.3.5 Protocolo de eutanásia.....	25
5.4 Modelo experimental <i>in vitro</i> .....	26
5.4.1 Local de execução .....	26
5.4.2 Cultura de células da linhagem <i>macrophage-like</i> RAW 264.7 .....	26
5.4.3 Dosagem de óxido nítrico (NO) produzido por células RAW 264.7 .....	26
5.5 Análise estatística.....	27
<b>6 RESULTADOS</b> .....	<b>28</b>
6.1 Padronização da inflamação peritoneal induzida por carragenina .....	28
6.2 Avaliação <i>in vivo</i> do efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas da <i>Annona crassiflora</i> .....	28

<b>6.3 Efeito do extrato aquoso das folhas da <i>Annona crassiflora</i> na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 .....</b>	<b>31</b>
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>36</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>37</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O Cerrado é um bioma que se estende pelo território nacional, ocupando áreas dos estados da Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Piauí, São Paulo, Tocantins e o Distrito Federal. É o segundo maior bioma brasileiro abrangendo cerca de 24% da área nacional, sendo que o primeiro é o da Floresta Amazônica. O Cerrado constitui um dos 34 *hotspots*. Esse termo está relacionado às áreas críticas de conservação e obedece dois conceitos principais, sendo eles, ameaça e endemismo, uma vez que de suas 12.669 espécies confirmadas, 4.125 são endêmicas e mesmo com sua importância ecológica, até 2008, havia perdido cerca de 47,48% da sua cobertura vegetal (COSTA et al., 2019; FORZZA et al., 2012; KLINK; MACHADO, 2005; MITTERMEIER et al., 2004).

Frutos e derivados de espécies vegetais, presentes no Cerrado brasileiro, ocupam lugar de destaque na alimentação da população local por possuírem alto teor de açúcares, proteínas, vitaminas e sais minerais (ALMEIDA; SANO, 1998). Na literatura, nos últimos anos, têm sido atribuídos às frutas e vegetais propriedades antioxidantes relacionadas à presença de compostos fenólicos, como os flavonoides, e à vitamina C (GONÇALVES; LAJOLO; GENOVESE, 2010; MOREIRA-ARAÚJO et al., 2019).

O bioma Cerrado possui diversas espécies vegetais com uso popular bem estabelecido e algumas pertencem à família Annonaceae, a qual abriga, mundialmente, cerca de 130 gêneros e 2.300 espécies (ARAYA, 2004). O gênero *Annona* é reconhecido por incluir espécies frutíferas, como a *Annona crassiflora*, *Annona squamosa* e a *Annona muricata*, produtoras dos frutos araticum, fruta do conde e graviola, respectivamente, os quais são utilizadas no comércio brasileiro, em diversas receitas, incluindo sucos e sorvetes, além de serem consumidos *in natura* (LAGE, 2011; LORENZI; MATOS, 2002).

Espécies pertencentes ao gênero *Annona* dispõem de compostos bioativos como flavonoides, taninos e alcaloides. Essas substâncias estão amplamente distribuídas pelo reino vegetal e possuem atividade anti-inflamatória cientificamente comprovada (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Diversos estudos mostraram atividades antimalárica (PIMENTA; GARCIA; VALE, 2014), anti-inflamatória e analgésica (ROCHA et al., 2015), anti moluscicida (SANTOS; SANT'ANA, 2001) e anti Leishamania (MESQUITA et al., 2005) em diferentes espécies do gênero *Annona* e essas atividades foram atribuídas às diversas substâncias bioativas, incluindo aquelas citadas acima.

*Annona crassiflora* é uma espécie produtora de metabólitos secundários bioativos, tais como os flavonoides, taninos e alcaloides com atividades anti-inflamatórias (COUTINHO;

MUZITANO; COSTA, 2009). Contudo, até o presente momento, não existem trabalhos na literatura que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso da referida espécie. Portanto, investigar possíveis ações anti-inflamatórias do extrato aquoso liofilizado das folhas da *Annona crassiflora* poderá fornecer fundamentação científica para a sua utilização na produção de novos medicamentos úteis no tratamento de desordens inflamatórias.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 *Annona crassiflora*

Araticum, marolo e pinha do cerrado são nomes populares da espécie *Annona crassiflora*, pertencente à família Annonaceae. É uma espécie nativa do Cerrado brasileiro e está presente nos estados de Minas Gerais, São Paulo, Bahia, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Tocantins, Goiás, Maranhão, Piauí e Distrito Federal. Classificada como arbórea apresentando de 4 a 8 metros de altura, sendo que sua copa pode chegar a 4 metros de diâmetro. Seu tronco é tortuoso ou ereto variando entre 20 a 30 cm de diâmetro, revestido por casca áspera e corticosa que é resistente ao fogo. As folhas são alternas e simples e suas flores são classificadas como solitárias, axilares e têm pétalas engrossadas e carnosas (ALMEIDA; SANO, 1998; ARRUDA et al., 2018; LAGE, 2011; LORENZI et al., 2002; UGOLINE, 2012).

As sementes apresentam morfologia do tipo elípticas e achatadas de coloração marrom. Seus frutos são de forma oval ou arredondada, superfícies tomentosas, verde quando se desenvolvem e marrom quando maduros, geralmente, com peso entre 0,5 a 4,5 Kg. A polpa do fruto é levemente adocicada com coloração variando entre branco e amarelo. O florescimento da *Annona crassiflora* ocorre, em sua maioria, em outubro a novembro com frutificação em dezembro e com a maturação dos frutos entre fevereiro e abril. Cerca de 5 a 20 frutos são produzidos por uma árvore adulta. Os animais são os principais dispersores das sementes, que ocorrem mais em estação chuvosa, entre novembro e março (ARRUDA et al., 2015, 2018, 2019; LAGE, 2011; SOARES et al., 2009).

### 2.2 Atividades biológicas

Diversos estudos demonstraram em extratos das folhas, sementes, casca e frutos de *A. crassiflora* propriedades farmacológicas relacionadas a atividades bactericida (RIBEIRO et al., 2018), antimalárica (PIMENTA; GARCIA; VALE, 2014), antimutagênica (ROCHA et al., 2015), larvicida (OMENA et al., 2007), moluscocida (SANTOS; SANT'ANA, 2001), nematicida (MACHADO et al., 2015), anti-Leishmania e trypanocida (MESQUITA et al., 2005). Esses efeitos estão associados à presença de compostos bioativos na referida espécie.

Várias acetogeninas foram isoladas do gênero *Annona* e demonstraram atividade antiprotozoária contra *L. donovani* (RAYNAUD-LE et al., 2004).

O efeito inseticida de diferentes famílias de plantas, encontradas no Cerrado brasileiro, foi analisado e os resultados mostraram que os extratos etanólicos de sementes da *A. glabra*, seguidos de extratos da casca de raiz da *A. crassiflora* e dos extratos de sementes da *A. squamosa* demonstram maior atividade microbicida contra larvas do mosquito *A. aegypti* (OMENA et al., 2007).

O extrato etanólico das folhas da *A. Crassiflora* demonstrou atividade nematicida contra *Caenorhabditis elegans* (MACHADO et al., 2015). O extrato etanólico das folhas da *A. crassiflora* também demonstrou efeito bactericida sobre isolados de *E. coli* e *Staphylococcus* spp, sendo que a remoção dos taninos a partir desse extrato, levou à perda de tal efeito, indicando que esses metabólitos são potentes agentes anti-bacterianos (RIBEIRO et al., 2018).

Além das atividades antimicrobianas, estudos utilizando extratos provenientes das folhas e das sementes da *A. crassiflora* demonstraram efeitos antiproliferativos em neoplasias em seres humanos, como em casos de leucemia, melanoma, carcinoma de cólon e tumor cerebral (FORMAGIO et al., 2015). Outro estudo em modelos experimentais *in vitro*, utilizou o extrato etanoico da madeira dessa espécie e foi observada atividade antitumoral e toxicidade em tumores de Ehrlich (MESQUITA et al., 2009).

Atividade analgésica também foi evidenciada em animais tratados com extrato hidroalcolico das folhas desidratadas da *A. crassiflora*. A análise fitoquímica desse extrato demonstrou a presença de um pentatosídeo análogo à quercetina, um flavonoide com diversas propriedades farmacológicas, dentre elas, atividade analgésica. Camundongos machos, Swiss e BALB/c, tratados com o extrato e submetidos a teste de nocicepção induzida por formalina mostraram redução no tempo de lambida da pata, confirmando a ação analgésica do extrato hidroalcolico (OLIVEIRA et al., 2018). O flavonoide quercetina também foi identificado em extrato metanoico das folhas secas da *A. crassiflora*, o qual foi utilizado em modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina. Neste estudo, os resultados mostraram que o extrato metanoico das folhas da *A. crassiflora* possui atividade anti-inflamatória, pois houve uma redução significativa do edema de pata no grupo tratado com a *A. crassiflora*, em relação ao grupo controle (ROCHA et al., 2015).

Diante do exposto, é notável que compostos bioativos, tais como os flavonoides, taninos e alcaloides, apresentam atividades anti-inflamatórias e muitas espécies vegetais são capazes de produzir esses metabólitos secundários, dentre elas, a *A. crassiflora*. Neste sentido, apesar de vários estudos investigarem possíveis propriedades biológicas de diversos derivados vegetais da *A. crassiflora*, até o presente momento, ainda não foi avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas da referida espécie.

### 2.3 Inflamação, células e mediadores inflamatórios

A inflamação é um processo inerente ao organismo gerada por estímulos nocivos químicos, físicos e biológicos. A principal função de uma resposta inflamatória é eliminar a injúria e estabelecer a homeostase do tecido lesionado. A resposta inflamatória envolve os componentes plasma, vasos sanguíneos, componentes celulares e extracelulares. É caracterizada por fatores pró e anti-inflamatórios e pode ser classificada como inflamação aguda ou crônica (SANTOS et al., 2019; SILVA; MACEDO, 2011).

A inflamação aguda é uma reação sistêmica frente à estímulos locais ou sistêmicos. Seu objetivo é reestabelecer a homeostase e minimizar os danos ao tecido do hospedeiro. Nessa fase, são evidenciados vários efeitos sistêmicos como febre e alterações hormonais, como é o caso do cortisol cuja concentração plasmática aumenta. No local da injúria é possível observar sinais como dor, rubor, aumento de volume e calor (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2019). Cerca de noventa minutos após ocorrer a lesão, os hepatócitos, linfonodos e baço aumentam a síntese das proteínas de fase aguda, principalmente sob influência das interleucinas (IL) IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6, liberadas a partir de mastócitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. As proteínas de fase aguda, tais como, a proteína C reativa, amilóide sérica e haptoglobina (Hp) funcionam como biomarcadores importantes para monitoração da inflamação e para diagnóstico de alterações subclínicas (CARVALHO-FILHO et al., 2019). A inflamação aguda pode evoluir para a cura ou para a cronificação (SANTOS et al., 2019).

Se o processo inflamatório é persistente, ocorre a liberação exagerada de proteases, espécies reativas de oxigênio e mediadores inflamatórios. Ainda, histologicamente, haverá aumento de infiltrado inflamatório de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos e, em alguns casos, necrose e fibrose tecidual. Nesse caso, a inflamação aguda passa a ser uma condição crônica. A inflamação crônica contribui para diversos distúrbios fisiológicos, como doenças neurodegenerativas e neoplasias. Citocinas pró-inflamatórias em altos níveis e óxido nítrico (NO) no plasma estão relacionados à dor em pacientes que se encontram em uma condição inflamatória crônica (BACON; OPPENHEIM, 1998; CANETTI et al., 2001; SMITH; LIZA, 2017).

Diversas células leucocitárias são importantes no momento do processo inflamatório, dentre elas, os neutrófilos que estão presentes na corrente sanguínea e quando há o estímulo inflamatório, migram para o local lesionado. Em desordens que há o envolvimento de agentes bacterianos é possível observar exsudato purulento, constituído por debris celulares, incluindo

de neutrófilos (PORTH, 2010). A presença de neutrófilos é característica de inflamações agudas, pois sua migração é relativamente rápida, mas pode estar presente também em desordens crônicas. A persistência dessas células no sítio inflamatório por período prolongado pode levar à liberação excessiva de proteases e espécies reativas de oxigênio, podendo causar lesões aos tecidos adjacentes (LEITE, 2012; SAVILL; HENSON; HASLETT, 1989; SOUSA et al., 2010).

Além de neutrófilos, no local da inflamação, há a presença de outros leucócitos, como os monócitos. Estas células têm origem na medula óssea e são distribuídas pelo organismo por meio da corrente sanguínea. Quando chegam ao tecido lesionado, diferenciam-se em células fagocíticas, os macrófagos. A diferenciação de macrófagos a partir de monócitos é influenciada por diversos fatores, dentre eles, os mediadores presentes no microambiente inflamatório (GEISSMANN et al.; 2010; KUMAR; JACK, 2006). Os macrófagos, em relação aos neutrófilos, apresentam aparecimento mais lento, no local inflamado (DALE et al., 2008).

## **2.4 Óxido Nítrico (NO)**

O óxido nítrico é um dos vários mediadores produzidos e liberados por células que participam de uma resposta inflamatória. O NO é um radical livre e possui característica lipofílica gasosa, sendo capaz de se difundir através das membranas biológicas. A síntese do NO envolve a ação da enzima citoplasmática óxido nítrico sintase (NOS), a qual catalisa a produção de NO a partir do aminoácido L-arginina. Existem diferentes isoformas da enzima NOS. Macrófagos expressam a óxido nítrico sintase induzível (iNOS), cuja síntese é induzida por estímulos inflamatórios. As outras isoformas são as enzimas óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) e neuronal (nNOS), cuja expressão é constitutiva, ou seja, produzidas em condições fisiológicas, na ausência de inflamação, em células endoteliais e neuronais. A iNOS pode ser ativada em diferentes tipos celulares, incluindo macrófagos e células endoteliais, quando estimulados por citocinas (ALDERTON et al., 2001; BRUCKDORFER, 2005; LEITE, 2012).

O NO possui diversos efeitos no organismo participando da hiperalgesia, vasodilatação, redução da agregação e adesão plaquetárias, além de ser citotóxico para determinados microrganismos e células tumorais. Além disso, o NO possui atividade antimicrobiana direta e é capaz de modular a resposta imune do hospedeiro. A exposição de macrófagos a agentes nocivos ou citocinas pró-inflamatórias aumenta a expressão da iNOS e, conseqüentemente, aumenta os níveis de NO produzidos e liberados por essas células. A produção excessiva de NO pode levar à lesão tecidual (FANG; VÁZQUEZ-TORRES, 2019; LEITE, 2012; THAO et



al., 2015; WOTHERSPOON et al., 2004). Dessa forma, a inibição da produção persistente de NO em desordens inflamatórias representa um benefício terapêutico.

Em 1879, Johann Peter Griess desenvolveu uma metodologia para quantificação do NO produzido em diferentes modelos experimentais. Após três décadas, uma relação direta foi encontrada, por meio da reação de Griess, entre a presença de óxido nítrico na urina e a ocorrência de infecção no trato urinário. Esta reação ficou conhecida como o método de Griess (CRUICKSHANK; MOYES, 1914; GREEN et al., 1982). Esse método baseia-se na reação, em meio ácido, entre o nitrito presente na amostra com uma amina aromática, produzindo um sal de diazônio. O sal reage com a 3-hidro-1,2,3,4-tetraidrobenzilquinolina, uma molécula orgânica, e resulta em um produto de coloração rósea. A intensidade da cor é diretamente proporcional à concentração de NO na amostra e determinada a partir de uma curva padrão de nitrito previamente construída com concentrações crescentes de nitrito (LEITE, 2012; TSIKAS, 2006).

## **2.5 Drogas anti-inflamatórias**

Para o tratamento de desordens inflamatórias, medicamentos convencionais, como anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, são comumente utilizados.

Os AINEs são capazes de inibir a enzima ciclo oxigenase (COX), impedindo assim a formação de prostaglandinas e tromboxanos. São fármacos com eficácia comprovada, mas cujo uso prolongado está relacionado a efeitos adversos importantes, tais como cardiovasculares, gastrointestinais e renais. Os anti-inflamatórios esteroidais mimetizam os efeitos do cortisol endógeno sobre o tônus da atividade do sistema imunológico, reduzindo-o de modo significativo, já que são utilizados em doses supra fisiológicas, ou seja, doses farmacológicas, para produzirem, de fato, efeito anti-inflamatório. Contudo, são fármacos que produzem efeitos metabólicos, sobre o metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, bem como influenciam as funções de praticamente todos os sistemas orgânicos. Desse modo, produzem, em paralelo aos efeitos anti-inflamatórios, muitos efeitos adversos, incluindo hipertensão, hiperglicemia, osteoporose, perda de massa muscular, redistribuição da gordura corporal, nanismo, cataratas, insuficiência adrenal e outros (JO et al., 2010; SOFIADIYA et al., 2014).

Nesse sentido, apesar da existência de grande arsenal de drogas anti-inflamatórias, ainda são relevantes estudos que possam levar à descoberta de novos agentes com potencial atividade anti-inflamatória e menos efeitos adversos. Diversos estudos da literatura apontam que as plantas podem ser fontes de compostos bioativos com propriedades anti-inflamatórias. Por

exemplo, compostos que podem reduzir a migração de leucócitos, produção de citocinas e o estresse oxidativo em um sítio de inflamação. Vale ressaltar que a diminuição do estresse oxidativo resulta em redução da liberação de mediadores inflamatórios a partir de células inflamatórias. Assim, a flora brasileira, incluindo o Cerrado, pode abrigar muitas espécies vegetais com potencial uso terapêutico no futuro. Os grupos fitoquímicos amplamente estudados com o intuito de descobrir ações anti-inflamatórias e antimicrobianas são os flavonoides, alcaloides e glicosídeos (KIM et al., 2012; LAGO et al., 2014; NIJVEDT et al., 2001; PAN et al., 2013; SANTANA et al., 2016).

## 2.6 Modelos experimentais para avaliar potencial anti-inflamatório de novas substâncias

Diversos modelos experimentais *in vivo* e *in vitro* para investigações sobre possíveis ações anti-inflamatórias de novos compostos bioativos são descritos na literatura.

A atividade anti-inflamatória do extrato etanoico bruto das folhas da *Annona vepretorum* por meio de diversos testes, incluindo a contagem de leucócitos totais em exsudato peritoneal. O estudo utilizou camundongos Swiss tratados com diferentes concentrações do extrato (25, 50 e 100 mg/Kg; v.o.) uma hora antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de carragenina 1% e, após quatro horas, fez-se a coleta do exsudato peritoneal e a contagem de leucócitos totais. Os resultados obtidos mostraram que o extrato etanoico bruto de *A. vepretorum* inibiu a migração de leucócitos, quando comparada ao grupo controle. A análise fitoquímica do extrato bruto revelou a presença de fenóis, esteroides, terpenoides e flavonoides (SILVA et al., 2015).

A contagem de leucócitos que avaliou a ação anti-inflamatória de frações do extrato e extrato bruto de *Eugenia uniflora*. Camundongos Swiss foram tratados por via oral (v.o.) com o extrato bruto e suas frações (50, 100 e 200 mg/Kg) e, após trinta minutos, foram tratados com 0,25 mL de carragenina 1% intraperitoneal (i.p). Após quatro horas, o exsudato peritoneal foi coletado e realizada a contagem de leucócitos totais. O tratamento com as diferentes concentrações do extrato mostrou inibição significativa da migração de leucócitos em relação ao grupo controle (FALCÃO et al., 2018).

De modo semelhante, possível ação anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Licania rígida* Bents's foi avaliada por meio da contagem de leucócitos totais em exsudato peritoneal. Neste estudo, camundongos Swiss foram tratados com (i) NaCl 0,9%; (ii) Dexametasona (5 mg/Kg); extrato (25 mg/Kg). Todos os grupos receberam carragenina 1% i.p. Após quatro horas, os animais foram mortos e os exsudatos foram coletados. Os resultados

obtidos mostraram redução do infiltrado leucocitário, sugerindo que a referida espécie possui efeito anti-inflamatório (SANTOS et al., 2019).

Diante do exposto, a mensuração do infiltrado leucocitário em peritonite induzida por carragenina é um método bem estabelecido na literatura para investigar possível ação anti-inflamatória de derivados vegetais. Com a mesma finalidade, métodos experimentais para quantificação da produção e/ou liberação de mediadores inflamatórios a partir de células no sítio de inflamação ou de linhagens celulares que mimetizam as ações de células próprias do organismo animal, também permitem tal investigação.

Um estudo *in vitro* utilizando a linhagem *Macrophage-like* RAW 264.7 avaliou a atividade anti-inflamatória de *Miliusa balansae*, uma planta da família Annonaceae, por meio da quantificação de NO em sobrenadantes de cultura de células RAW 264.7 estimuladas com LPS e tratadas com o extrato utilizando o método de Griess. A reduzida produção de NO nessas condições experimentais sugeriu que o extrato metanoico de *M. balansae* apresenta efeito anti-inflamatório (THAO et al., 2015). Outro estudo, avaliou propriedades anti-inflamatórias do extrato etanoico da casca do caule de *Terminalia catappa* em modelo experimental *in vitro*, utilizando células *Macrophages* RAW 264.7, por meio da determinação da produção de óxido nítrico pelo método de Griess. As células foram pré tratadas com diferentes concentrações do extrato (5 – 100 mg/Kg) e, em seguida, estimuladas com LPS. O pré tratamento com o extrato inibiu significativamente a produção de NO induzido por LPS de maneira dose-dependente da concentração do extrato. Contudo, o extrato não alterou a produção de NO em células não estimuladas pelo LPS (ABIODUN et al., 2016).

Portanto, uma vez que os métodos acima estão bem estabelecidos na literatura como estratégias experimentais para investigar possíveis ações anti-inflamatórias de diversos compostos, o presente estudo utilizou essa metodologia para avaliar possível atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora*.

## **2.7 Linhagem celular *macrophage-like* RAW 264.7**

Mediadores inflamatórios, tais como, quimionas, eicosanoides, histamina, bradicinina, neuropeptídeos e NO são produzidos por células inflamatórias teciduais e circulantes, dentre elas, leucócitos, macrófagos, células endoteliais e fibroblastos intersticiais já nos estágios iniciais de uma reação inflamatória. Os macrófagos participam da produção, mobilização, ativação e regulação de células inflamatórias (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

Na pesquisa, de modo geral, culturas primárias de leucócitos têm sido amplamente utilizadas como instrumentos para avaliação de respostas imunológicas sob diferentes condições experimentais. A linhagem *macrophage-like* RAW 264.7 foi obtida a partir de um tumor induzido pelo vírus da leucemia murina de Abelson e tem sido utilizada em modelos experimentais *in vitro* como uma ferramenta para mimetizar as funções de macrófagos (CORSINI et al., 2011; HUANG; WELLS, 2014; RASCHKE et al., 1978; SMITH; LIZA, 2017).

### 3 JUSTIFICATIVA

A espécie *A. crassiflora* contém flavonóides e outros metabólitos secundários com atividades biológicas diversas descritas na literatura. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório do extrato aquoso dessa importante espécie do Cerrado brasileiro. Portanto, investigar possíveis ações anti-inflamatórias do extrato aquoso liofilizado das folhas da referida espécie em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*, poderá fornecer fundamentação científica para o uso da *A. crassiflora* na produção de novos medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias. Cabe ressaltar que 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.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar os efeitos farmacológicos anti-inflamatórios agudos do extrato aquoso liofilizado das folhas da espécie vegetal *Annona crassiflora* utilizando modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

### 4.2 Objetivos específicos

- a) Preparar o extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*.
- b) Padronizar o método para indução da inflamação peritoneal com carragenina em camundongos machos da linhagem BALB/c;
- c) Avaliar a ação anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* sobre a inflamação peritoneal induzida por carragenina;
- d) Quantificar a produção de óxido nítrico (NO) produzido por células RAW 264.7 tratadas com o extrato aquoso das folhas da *A. crassiflora*.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 Material vegetal

A espécie *A. crassiflora*, a partir da qual foram coletadas as folhas para a preparação do extrato aquoso, foi previamente identificada por biólogo competente e uma exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Número de Registro HUFU 73547).

Para a preparação do extrato, as folhas da *A. crassiflora* foram coletadas em campos de vegetação espontânea em novembro/2018, na Fazenda Santa Rita, em Lassance, MG (Coordenadas geográficas: Latitude mínima: 17° 59' 14,3" S; Longitude mínima: 44° 44' 42,5" W) e, gentilmente, cedidas pelo Prof. Dr. Hudson Armando Nunes Canabrava.



**Figura 1.** *Annona crassiflora*. **Origem:** Fazenda Santa Rita, Lassance, MG. Coordenadas geográficas: Latitude mínima: 17° 59' 14,3" S; Longitude mínima: 44° 44' 42,5" W. **Fonte:** a autora (2018).

### 5.2 Obtenção do extrato aquoso

Após a colheita, as folhas foram separadas dos galhos e lavadas em água corrente e em água destilada. Em seguida, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C durante 48 horas. Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador e colocadas em provetas contendo água destilada na proporção de 10% (m/v) por 48 horas à temperatura ambiente. O extrato aquoso obtido foi filtrado em funil contendo algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. Posteriormente, o extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e acondicionado à temperatura – 20 °C. Após o congelamento, o extrato foi liofilizado a – 40 °C até a total remoção do conteúdo de água. O extrato aquoso liofilizado das folhas da *A.*

*crassiflora* (EAAC) obtido foi pesado e acondicionado em freezer a – 20 °C até a data da utilização.

### **5.3 Modelo experimental *in vivo***

#### **5.3.1 Local de execução**

Os experimentos foram realizados nos Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais e de Farmacologia Geral do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), e nos Laboratórios de Experimentação Animal do Biotério Central da Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU) (REBIR-UFU).

#### **5.3.2 Animais**

Foram utilizados camundongos da linhagem BALB/c machos, pesando entre 20 a 30 gramas. Os animais foram fornecidos pela Rede de Biotérios de Roedores (REBIR) da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos em pesquisa animal recomendados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), após aprovação da Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) da UFU (PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 006/18).

#### **5.3.3 Padronização do tempo para indução da inflamação peritoneal induzida por carragenina (CGN)**

Camundongos BALB/c foram divididos em dois grupos (G1 e G2; n = 2 animais/grupo) e mantidos sob restrição hídrica e alimentar por 30 minutos, antes do início dos tratamentos por via oral. Inicialmente, os animais foram pesados e a massa corporal média dos animais, em cada grupo, foi utilizada para o cálculo das doses orais do veículo e dos extratos. Em seguida, os animais, em ambos os grupos, foram tratados com solução de carboximetilcelulose (CBX) 0,5%, por via oral (v.o.). Utilizou-se a CBX por ser o veículo para solubilização do extrato aquoso liofilizado das folhas da *A. crassiflora*. A administração por v.o. da CBX (e dos extratos, posteriormente) foi realizada utilizando-se cânula de gavagem específica para camundongos e a dose máxima administrada foi de 1,0 mL/100 g. Sessenta minutos após os tratamentos, os



animais receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de carragenina (CGN) 1% (200 µL). Posteriormente, após 4 e 6 horas, os animais dos grupos G1 e G2 foram submetidos a eutanásia e a cavidade peritoneal foi lavada com 4 mL de solução salina tamponada com fosfatos (PBS: *phosphate buffered saline*), 1X, pH 7,2, gelada. O abdômen foi massageado e as células da cavidade peritoneal foram coletadas por aspiração do lavado peritoneal. Após centrifugação do lavado peritoneal (120 g, 4 °C, 8 minutos), os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram usados para contagens global e diferencial de leucócitos. Para a contagem de leucócitos totais em câmara de Neubauer, uma alíquota do sedimento foi diluída (1:10) em líquido de Turk.

#### 5.3.4 Indução da inflamação peritoneal por carragenina

Após a padronização do tempo para indução da inflamação peritoneal por CGN 1%, foi investigada possível ação anti-inflamatória do EAAC. Camundongos BALB/c foram divididos em quatro grupos (G1 a G4; n = 8). Os animais foram pesados e mantidos sob condições de jejum alimentar e restrição hídrica por 30 minutos, antes dos tratamentos por via oral. Em seguida, os animais, em cada grupo, receberam os seguintes tratamentos:

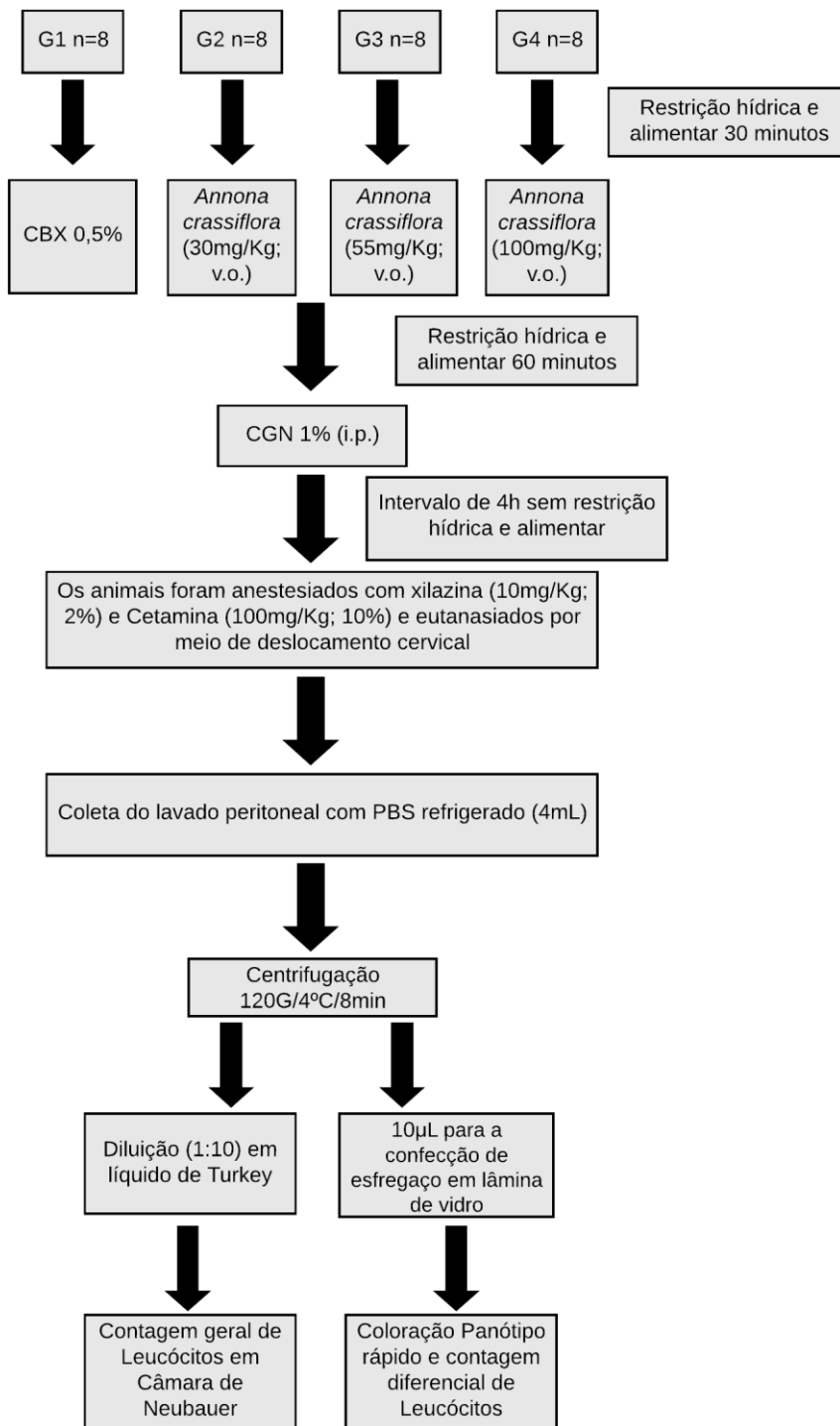
G1: CBX 0,5%, (v.o.);

G2: EAAC solubilizado em CBX 0,5%, v.o., na dose de 30 mg/Kg;

G3: EAAC solubilizado em CBX 0,5%, v.o., na dose de 55 mg/Kg;

G4: EAAC solubilizado em CBX 0,5%, v.o., na dose de 100 mg/Kg.

Após sessenta minutos, os animais em todos os grupos (G1 a G4) receberam injeção intraperitoneal (i.p.) de CGN 1%. A CGN é um agente inflamatório que induz a ativação do sistema complemento e a liberação de mediadores inflamatórios (DUTRA et al., 2006; PATIL et al., 2019). Após quatro horas a administração da CGN 1%, os animais dos grupos G1 a G4 foram anestesiados (Xilazina 10mg/Kg e Cetamina 100mg/Kg) e submetidos a eutanásia por deslocamento cervical. Em seguida, foi feita uma incisão no abdômen e a coleta dos exsudatos peritoneais para as contagens de leucócitos. A contagem de leucócitos totais seguiu o protocolo descrito no item 3.3.3 (**Figura 2**). Para a contagem diferencial, uma alíquota dos sedimentos foi usada para preparar esfregaços em lâmina de vidro e, após coloração com corante Panótico (Instant Prov, Newprov, código 1319), foi realizada a contagem diferencial de leucócitos.



**Figura 2.** Fluxograma do modelo experimental *in vivo*. **Fonte:** a autora (2019).

### 5.3.5 Protocolo de eutanásia

Os animais foram anestesiados com Xilazina e Cetamina (10 e 100 mg/kg, i.p., respectivamente) e, após a sedação, foram submetidos à eutanásia por meio de deslocamento cervical.

## 5.4 Modelo experimental *in vitro*

### 5.4.1 Local de execução

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de pesquisa dos Departamentos de Farmacologia (Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais) e de Biofísica (Laboratório de Biologia Molecular e Celular), do Instituto de Ciências Biomédicas (ICBIM), da Universidade Federal de Uberlândia (UFU).

### 5.4.2 Cultura de células da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7

Macrófagos murinos da linhagem *macrophage-like* RAW 264.7, habitualmente armazenados em tanque nitrogênio líquido, foram descongelados à temperatura ambiente e adicionados a tubos falcons com 10 mL de meio RPMI 1640 (Cultilab, Campinas, Brasil; inativado a 56 °C por 30 min), incompleto (sem soro fetal bovino (SFB)). Em seguida, as células foram centrifugadas (5 minutos, 1000 g, 4 °C). O sedimento foi ressuspenso em 5 mL de meio RPMI contendo SFB a 5% (meio completo, RPMI-SFB, suplementado com 25 mM de HEPES, 2 mM de L-glutamina, 3 mM de bicarbonato de sódio, antibióticos (penicilina G a 100 U/mL e estreptomicina a 100 µg) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) e incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C. A cultura foi mantida por meio de passagens seriadas, utilizando-se *cell scraper*, a cada dois dias com troca do meio RPMI-SFB.

### 5.4.3 Dosagem de óxido nítrico (NO) produzido por células RAW 264.7

A dosagem de óxido nítrico (NO) foi realizada pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Células RAW 264.7 foram colocadas em placas de cultura contendo 96 poços (2x10<sup>6</sup> células/200µL/poço) e incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Em seguida, o meio de cultura foi removido e as células foram tratadas com o EAAC previamente filtrado em membrana esterilizante (0,22 µm) em diferentes concentrações (1000, 500, 250, 125, 62,5,

31.25, 15.625, 7.812, 3.9, 1.953, 0,976 e 0,488  $\mu\text{g/mL}$ ). Células cultivadas apenas com meio RPMI-SFB constituíram os controles negativos de produção de NO (produção basal). Após os tratamentos, as células foram novamente incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> por 24 horas. Após o período de incubação, os sobrenadantes de cultura das células RAW 264.7 (100  $\mu\text{L}$  de sobrenadante/ poço) foram coletados, adicionados a microplacas de 96 poços e acrescentados de 100  $\mu\text{L}$  da solução de Griess para a dosagem de NO. Os resultados foram determinados pela leitura de D.O. (densidade óptica) a 570 nm, em um leitor de placas (TitertekMultiskan Plus, FlowLaboratories, McLean, EUA) e o óxido nítrico produzido foi quantificado por comparação a uma curva padrão construída com concentrações de nitrito crescentes de 1,6 a 200  $\mu\text{M}$ .

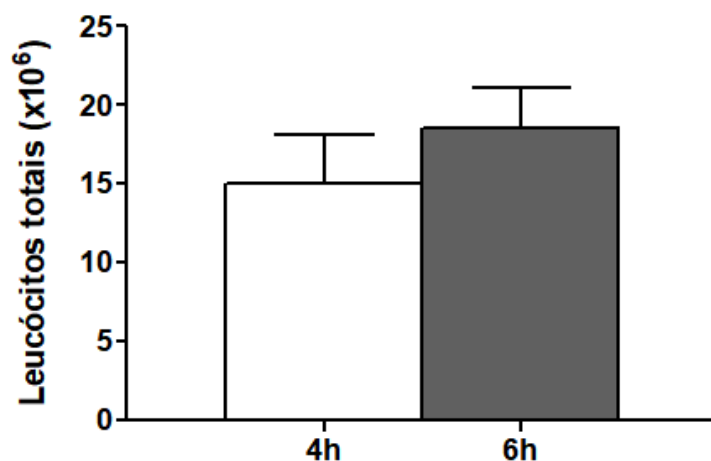
### **5.5 Análise estatística**

Para todos os cálculos estatísticos 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) ou média  $\pm$  S.D (desvio-padrão). O teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar se as variáveis exibiam distribuição normal. Foram utilizados os testes *t* de Student ou ANOVA de uma via, seguido pelo pós-teste de Bonferroni. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de  $p < 0,05$ .

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Padronização da inflamação peritoneal induzida por carragenina

Animais tratados com CBX 0,5% (v.o.) e CGN 1% (i.p.) foram mortos após 4 e 6 horas. A migração leucocitária para a cavidade peritoneal foi avaliada como um marcador de inflamação peritoneal induzida por CGN 1%. A resposta inflamatória peritoneal foi avaliada por meio da contagem de leucócitos totais no exsudato peritoneal. Os resultados obtidos mostraram que o número de leucócitos totais no infiltrado leucocitário, cujos exsudatos foram coletados após 4 e 6 horas, não foram estatisticamente diferentes. Estes resultados possibilitaram a padronização do tempo igual a 4 horas, após a injeção de CGN 1%, para a coleta dos exsudatos peritoneais ( $p > 0,05$ ) (**Figura 3**).



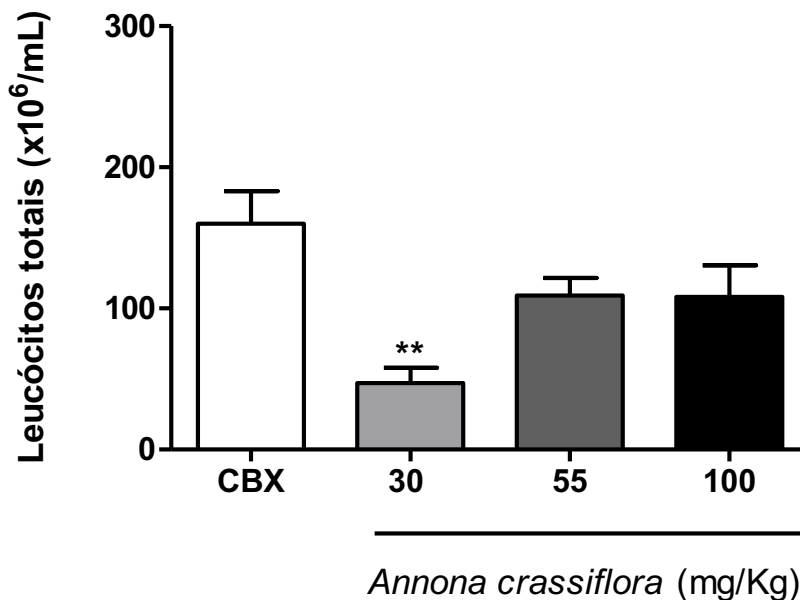
**Figura 3. Padronização da inflamação peritoneal induzida por carragenina (CGN) 1%.**

Não houve diferença estatística entre os grupos (4 h e 6 h). Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. A comparação entre os grupos CGN 1%, em cada intervalo de tempo, 4 e 6 horas, foi analisada pelo teste *t* de Student, ( $p > 0,05$ ).

### 6.2 Avaliação *in vivo* do efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*

Neste estudo, os resultados obtidos demonstraram que o EAAC, na dose 30 mg/Kg, reduziu significativamente a migração de leucócitos totais para a cavidade peritoneal, comparado ao grupo controle tratado apenas com o veículo CBX 0,5%. Todavia, os animais

tratados com o EAAC nas demais concentrações não exibiram diminuição do número de leucócitos totais na cavidade peritoneal (**Figura 4**).

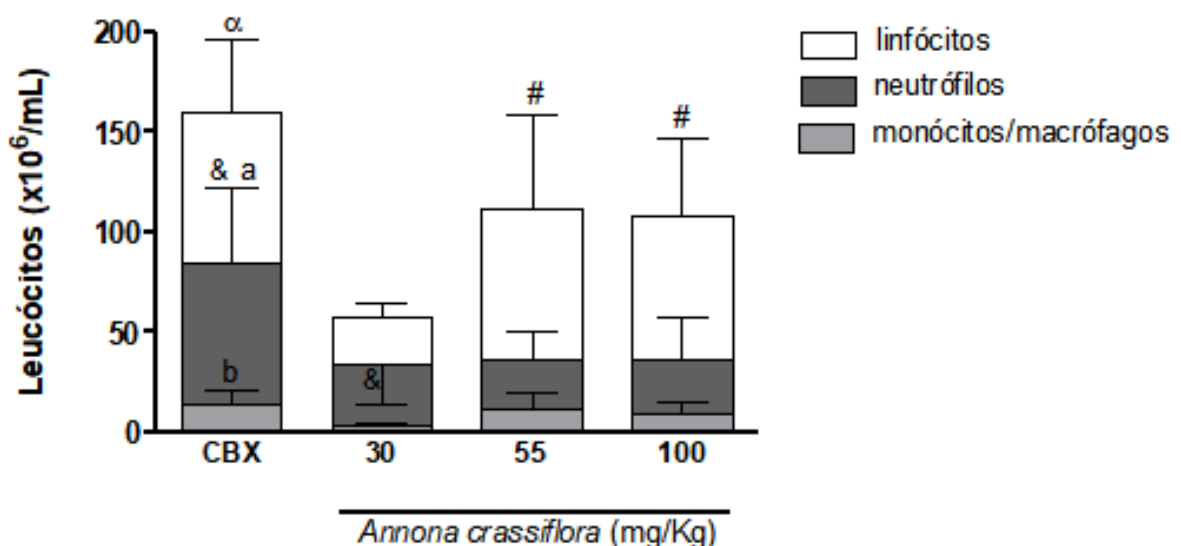


**Figura 4. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* sobre a inflamação peritoneal induzida por carragenina.** A concentração 30 mg/Kg do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* promoveu redução do número de leucócitos no exsudato peritoneal, comparado com o grupo controle tratado com carboximetilcelulose 0,5% (CBX). Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. As comparações entre os grupos CBX e *A. crassiflora* nas diferentes concentrações foram analisadas utilizando-se ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (\*\*  $p > 0,05$ ).

Uma vez que houve diminuição na migração de leucócitos totais em animais tratados com 30 mg/Kg do extrato da *A. crassiflora*, foi realizada a contagem diferencial de leucócitos (**Figura 5**) para identificarmos quais populações celulares estariam diminuídas neste grupo. Além disto, por meio da contagem diferencial também avaliamos alterações nas populações de leucócitos nos demais grupos experimentais.

Os dados obtidos mostraram que, comparado ao grupo controle (CBX), o EAAC (30 mg/Kg) reduziu a migração de mononucleares (monócitos e macrófagos) (**b**), mas não reduziu, de maneira estatisticamente significativa, as populações de neutrófilos e linfócitos. Nas maiores doses (55 e 100 mg/Kg), o EAAC foi capaz de reduzir o infiltrado de neutrófilos, embora não

tenha diminuído a migração leucocitária total, em relação ao grupo controle (a). As análises da contagem diferencial em cada grupo experimental, mostraram que nos grupos CBX e AC 30 mg/Kg não houve diferença entre a migração de linfócitos e neutrófilos; contudo, nesses grupos, o número de neutrófilos foi maior comparado aos monócitos/macrófagos (&); diferentemente, nos grupos de animais tratados com as maiores doses (55 e 100 mg/Kg), observou-se significativo predomínio de linfócitos em relação aos demais leucócitos (neutrófilos e monócitos/macrófagos) (#); somente no grupo controle (CBX) foi observado predomínio de linfócitos exclusivamente em relação aos monócitos/macrófagos (α) (Figura 5).



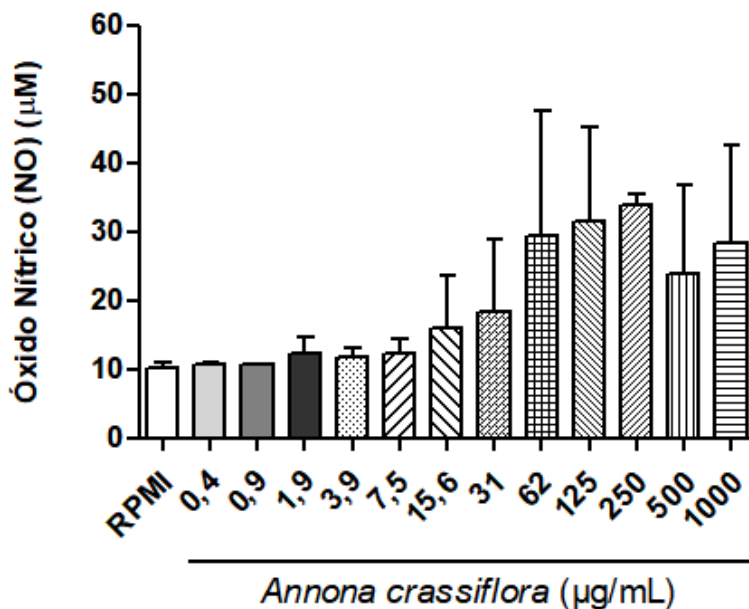
**Figura 5. Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* (AC) sobre a migração diferencial de leucócitos na inflamação peritoneal induzida por carragenina.** Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.D. As comparações entre os grupos CGN 1% e *A. crassiflora*, nas diferentes concentrações, foram analisadas utilizando-se ANOVA (*one-way analysis of variance*), seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas (nível de significância estatística:  $p < 0,05$ ). <sup>b</sup>Significância estatística entre a população de leucócitos “macrófagos/monócitos” no grupo controle, comparado ao grupo AC 30 mg/Kg. <sup>a</sup>Significância estatística entre a população de neutrófilos no grupo controle e os grupos AC 55 e 100 mg/Kg. Significâncias estatísticas em cada grupo: & diferença entre neutrófilos e monócitos/macrófagos; #predomínio de linfócitos comparado aos neutrófilos e aos

monócitos/macrófagos; <sup>a</sup>predomínio de linfócitos comparado aos monócitos/macrófagos.

### 6.3 Efeito do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7

Considerando que o EAAC (30 mg/Kg) reduziu o número de leucócitos totais, particularmente, de monócitos/macrófagos, na resposta inflamatória peritoneal induzida por CGN 1%, investigamos o seu efeito sobre a produção de mediadores inflamatórios, mais especificamente, óxido nítrico (NO), em células RAW 264.7.

Os resultados obtidos sugerem que o extrato tende a induzir a produção de NO de modo dose-dependente, como demonstrado pela maior quantidade de NO determinada em sobrenadantes das culturas de células RAW 264.7 tratadas com *A. crassiflora* nas maiores concentrações (62 a 1000  $\mu\text{g/mL}$ ). Contudo, comparando-se os níveis de NO detectados nos sobrenadantes de células tratadas com o EAAC e aqueles do grupo controle (células tratadas apenas com o meio RPMI), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes (Figura 6).



**Figura 6. Produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264.7 tratadas com extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora*.** Células *macrophage-like* RAW 264.7 ( $2 \times 10^6$  células/200  $\mu\text{L}$ /poço) foram cultivadas em placas de 96 poços a 37 °C e 5% de  $\text{CO}_2$  durante 24 horas. Em seguida, as células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato aquoso da *A. crassiflora* por 24 horas. Células tratadas apenas com o meio (RPMI) constituíram o grupo



controle negativo (produção basal) de produção de NO. A produção de óxido nítrico (NO) foi quantificada pelo método de Griess nos sobrenadantes das culturas, em cada condição de tratamento. Os dados estão expressos como média  $\pm$  S.E.M. de valores da concentração de NO ( $\mu$ M) determinados a partir de três experimentos independentes, realizados em triplicata. As comparações entre o grupo controle negativo e os grupos tratados foram analisadas utilizando-se ANOVA, seguido do teste de *Bonferroni* para comparações múltiplas ( $p > 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

No presente estudo, investigamos possível atividade anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas da *Annona crassiflora* em modelos experimentais *in vivo* e *in vitro*.

O modelo de inflamação peritoneal induzida por carragenina foi utilizado para avaliarmos o efeito do extrato aquoso da *A. crassiflora* em relação à migração leucocitária. Vários trabalhos da literatura têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios de derivados vegetais por meio da redução da população de neutrófilos em infiltrado inflamatório peritoneal induzido por carragenina (ACKERMAN et al., 1980; FALCÃO et al., 2018; FURTADO et al., 2016; PIRES et al., 2019). Em nosso estudo, foram realizadas as contagens total e diferencial de leucócitos a partir do exsudato inflamatório induzido por carragenina em cavidade peritoneal de camundongos machos BALB/c (20g – 30g).

Antes que fosse realizada a avaliação do efeito do extrato aquoso da *A. crassiflora* sobre o infiltrado peritoneal, foi padronizado o tempo de quatro horas entre o estímulo com carragenina 1% (i.p.) e a eutanásia. Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na magnitude do infiltrado leucocitário na cavidade peritoneal nos intervalos de quatro e seis horas. Dessa maneira, foi padronizado, a exemplo de outros trabalhos da literatura, o intervalo de quatro horas após a injeção i.p. de CGN 1% para a obtenção do lavado peritoneal e contagem dos leucócitos. Em estudo utilizando CGN i.p. para indução de inflamação peritoneal e posterior contagem de leucócitos, foi utilizado o intervalo de quatro horas entre a injeção intraperitoneal de CGN e a eutanásia (LONGHI-BALBINOT et al., 2012), corroborando com os resultados obtidos na padronização da inflamação peritoneal induzida por CGN no presente trabalho.

Após a padronização do tempo para indução da inflamação peritoneal com CGN, foi investigada a ação do extrato aquoso da *A. crassiflora* sobre a migração leucocitária para a cavidade peritoneal, após injeção i.p. de CGN. A contagem de leucócitos totais mostrou que o EAAC, na menor dose (30 mg/Kg), foi eficiente em reduzir o infiltrado inflamatório peritoneal em relação ao grupo controle. A partir da contagem de leucócitos totais, analisamos quais populações de células inflamatórias estariam reduzidas por meio da contagem diferencial de leucócitos (linfócitos, neutrófilos, monócitos/macrófagos). Os resultados obtidos mostraram redução da população de monócitos / macrófagos em exsudatos dos animais tratados com o EAAC 30 mg/Kg, comparado ao grupo controle. Nos exsudatos dos animais tratados com as maiores doses (55 e 100 mg/Kg), observou-se redução de neutrófilos infiltrantes, embora não tenha sido observada redução de leucócitos totais. Estes achados sugerem que o EAAC possui

potencial efeito de redução da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal em modelo experimental de inflamação induzida por CGN.

Analisando as populações de leucócitos dentro de um mesmo grupo, foi constatado que, no grupo controle a população de linfócitos foi maior que a de monócitos/macrófagos, mas não foi maior que a de neutrófilos e que a população de neutrófilos foi maior que a de monócitos/macrófagos, nesse mesmo grupo. A população de neutrófilos foi maior que a de monócitos/macrófagos no grupo tratado com a dose de 30 mg/Kg do EAAC. Apesar de na contagem geral as doses de 55 mg/Kg e 100 mg/Kg não terem sido eficientes em reduzir o infiltrado inflamatório peritoneal, foi observado que, nesses grupos, houve predomínio de linfócitos em relação à neutrófilos e monócitos/macrófagos.

Considerando o efeito do EAAC sobre a redução do infiltrado de monócitos/macrófagos na cavidade peritoneal dos animais tratados com a menor dose, investigamos o efeito do extrato sobre a produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264. Os resultados mostraram que células tratadas com as maiores concentrações do EAAC exibiram tendência a aumentar a produção de NO, contudo este efeito não foi estatisticamente significativo, quando comparado ao grupo controle (células não tratadas com o EAAC).

Estudos anteriormente realizados com extratos de diferentes partes de espécies pertencentes à família Annonaceae e ao gênero *Annona*, confirmaram o potencial anti-inflamatório de espécies como a *A. reticulata* (CHAVAN et al., 2012), *A. muricata* (DE SOUSA et al., 2010), *A. senegalensis* (YEO et al., 2011) e *A. sylvatica* (FORMAGIO et al., 2013). OLIVEIRA e colaboradores, no ano de 2018, mostraram que o extrato hidroalcolólico das folhas da *Annona crassiflora*, em concentrações crescentes (0,053 mg/Kg, 0,53 mg/Kg, 5,3 mg/Kg, 53 mg/Kg, 159 mg/Kg e 530 mg/Kg) foi capaz de reduzir o infiltrado inflamatório pleural nas contagens total e diferencial de leucócitos, em relação ao grupo controle tratado com LPS intratorácico. Desse modo, os dados obtidos no presente estudo corroboram com aqueles apresentados em estudos da literatura utilizando derivados vegetais de espécies do mesmo gênero da *A. crassiflora*. Vale destacar que é comum espécies do mesmo gênero compartilharem compostos bioativos.

Na contagem diferencial de leucócitos foi observada redução da população de monócitos/macrófagos no grupo tratado com a dose de 30 mg/Kg em relação ao grupo controle. Monócitos e macrófagos participam do sistema de fagócitos mononucleares. Constituem um sistema por possuírem origem comum, morfologia semelhante e capacidade de fagocitar. O monócito é originado na medula óssea, é distribuído ao sistema sanguíneo e, depois, aos diferentes tecidos. Quando chega nos tecidos sofre diferenciação e torna-se célula fagocítica

maior, os macrófagos. O macrófago possui funções importantes, dentre elas, a apresentação de antígenos, fagocitose e imunomodulação. As células polimorfonucleares, como os neutrófilos, embora sejam as primeiras a chegarem ao local lesionado, são logo acompanhadas dos monócitos que se diferenciam em macrófagos. Estas, por sua vez, participam da produção de citocinas, ativação e regulação de células inflamatórias (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005). Dessa forma, a o EAAC pode ter uma ação anti-inflamatória dose-dependente relacionada à ativação de monócitos/macrófagos.

Nesse sentido, investigamos o efeito do EAAC sobre a produção de NO em células RAW 264.7. Os resultados obtidos mostraram que o EAAC, nas maiores concentrações, tende a estimular a produção de NO em células RAW 264.7, embora não tenhamos evidenciado diferenças estatisticamente significantes em relação ao grupo controle. Estes achados corroboram com estudo que ao utilizar o extrato das folhas da *Annona muricata*, espécie do mesmo gênero, observou estimulação da produção de citocinas e de NO, sugerindo, então, que a referida espécie poderia ter efeitos pró-inflamatórios (KIM et al., 2016).

Portanto, diante do exposto, os dados obtidos neste estudo sugerem que o EAAC possui efeito anti-inflamatório por interferir com a capacidade de migração leucocitária, especialmente de monócitos; e, ao mesmo tempo, pode interferir com a ativação dessas células estimulando a produção de mediadores inflamatórios, tais como óxido nítrico. Assim, o EAAC pode apresentar, no contexto de uma resposta inflamatória, um efeito dual, anti – e pró – inflamatório.

## 8 CONCLUSÕES

a) Na inflamação peritoneal induzida por carragenina:

- O EAAC, na dose de 30mg/Kg, reduziu o número de leucócitos totais em exsudato inflamatório peritoneal.

- O EAAC (30mg/Kg) reduziu o infiltrado inflamatório de monócitos e macrófagos no exsudato inflamatório peritoneal.

- O EAAC nas maiores doses (55mg/Kg e 100mg/Kg) reduziu a migração de neutrófilos no exsudato inflamatório peritoneal.

b) Na produção de óxido nítrico (NO) por células RAW 264.7:

- O EAAC apresentou tendência a aumentar a produção de NO em células RAW 264.7 de modo dose-dependente.

c) Considerando os resultados obtidos nos modelos experimentais in vivo e in vitro, sugerimos que o extrato aquoso da *A. crassiflora* apresenta um efeito dual, anti e pró-inflamatórios, dose-dependente.

## REFERÊNCIAS

- ABIODUN, O. O. et al. Antiinflammatory and immunomodulatory activity of an ethanolic extract from the stem bark of *Terminalia catappa* L. (Combretaceae): *in vitro* and *in vivo* evidences. **Journal of Ethno-Pharmacology**, [S.l.], v. 4, n. 192, p. 309 – 319, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27452660>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- ACKERMAN, N. et al. Three day pleural infammation: a new model to detect drug effects on macrophage accumulation. **Journal Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [S.l.], v. 215, p. 588–595, 1980. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7441518>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- ALDERTON, W. K.; COOPER, C. E.; KNOWLES, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, [S.l.], v. 357, p. 593–615, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1221991/pdf/11463332.pdf>>. Acesso em: 14 out. 2019.
- ALMEIDA, S. P.; SANO, S. M. **Cerrado**: ambiente e flora. Planaltina, DF: EMBRAPA CPAC, 1998. Disponível em: < <http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=557990&biblioteca=CPAC&busca=autoria:%22SANO,%20S.M.%22&qFacets=autoria:%22SANO,%20S.M.%22&sort=&paginacao=t&paginaAtual=2>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- ARAYA, H. Studies on annonaceous tetrahydrofuranic acetogenins from *Annona squamosa* L. seeds. Bull. **National Institute for Agro-Environmental Sciences**, [Kannondai] v. 23, p. 77-149, 2004.
- ARRUDA, H. S.; ALMEIDA, M. E. F. **Frutos do cerrado**: panorama, resgate cultural e aproveitamento culinário. Saarbrücken: Novas Edições Acadêmicas, 2015.
- ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrientes and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Research International**, [Amsterdã], v. 123, p. 450 – 480, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31284996>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- 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**, [Amsterdã], v. 245, p. 738-749, 2018. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29287435>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- BACON, K. B.; OPPENHEIM, J. J. Chemokines in disease models and pathogenesis. **Cytokine & growth factor reviews**, [Amsterdã], v. 9, n. 2, p. 167 – 173, 1998. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9754710>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- BRUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicina**, [S.l.], v. 26, p. 3 – 31, 2005. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15722113>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- CANETTI, C. et al. Tumour necroses factor-alpha and leukotriene B(4) mediate the neutrophil migration in immune inflammation. **British Journal of Pharmacology**, London,

GB, v. 134, n. 8, p. 1619 – 1628, 2001. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11739237>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CARVALHO-FILHO, W. P. et al. Serum amyloid A and muscle activity biomarkers in horses submitted to equestrian show jumping. **Brazilian Journal of Veterinary Research**, São Paulo, v. 38, p. 668 – 671, 2019. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/pvb/v39n8/1678-5150-pvb-39-08-668.pdf>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CHAVAN, M. J. et al. Analgesic and anti-inflammatory activity of kaur-16-en-19-oic acid from *Annona reticulata* L. bark. **Phytotherapy Research**, [S.l.], v. 26, p. 273–276, 2012.

CORSINI, E. et al. In vitro evaluation of the immunotoxic potential of perfluorinated compounds (PFC)s. **Toxicology and Applied Pharmacology**, [S.l.], v. 250, p. 108–116, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21075133>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

COSTA, J. P. et al. Estrutura e diversidade de trechos de Cerrado *sensu stricto* às margens de rodovias no estado de Minas Gerais. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 29, p. 698 – 714, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982019000200698&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1980-50982019000200698&script=sci_arttext)>. Acesso em: 15 nov. 2019.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química** 1, [S.l.], v. 3, p. 241-256, 2009. Disponível em: <<http://rvq-sub.sbq.org.br/index.php/rvq/article/view/51/98>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

CRUICKSHANK, J.; MOYES, J. M. **British Medical Journal**, [S.l.], v. 2, p. 712, 1914.

DALE, D. C.; BOXER, L.; LILES, W. C. The phagocytes: neutrophils and monocytes. **Blood**, [S.l.], v. 112, n. 4, p. 935 – 945, 2008.

DE SOUSA, O. V. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanol extract of *Annona muricata* L. leaves in animal models. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 11, p. 2067 – 2078, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20559502>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

DUTRA, R. C. et al. Investigação das atividades analgésicas e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [S.l.], v. 16, n. 4, p. 469 – 474, 2006. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_abstract&pid=S0102-695X2006000400005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S0102-695X2006000400005&lng=en&nrm=iso&tlng=pt)>. Acesso em: 15 nov. 2019.

FALCÃO, T. R. et al. Crude extract and fractions from *Eugenia uniflora* linn leaves showed anti-inflammatory, antioxidant, and antibacterial activities. **Biomed Central Complementary and Alternative Medicine**, [London], v. 9, p. 18 – 34, 2018. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29523111>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

FANG, F. C.; VÁZQUEZ-TORRES, A. Reactive nitrogen species in host-bacterial interactions. **Science Direct**, [S.l.], v. 60, p. 96 – 102, 2019. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31200187>>. Acesso em 16 nov. 2019.

FORMAGIO, A. S. Composition and evaluation of the anti-inflammatory and anticancer

activities of the essential oil from *Annona sylvatica* A. St.-Hil. **Journal of Medicinal Food**, [S.l.], v. 16, p. 20–25, 2013. Disponível em: < <https://www.liebertpub.com/doi/10.1089/jmf.2011.0303>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

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**, [S.l.], v. 48, n. 4. p. 308–315, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25714885>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

FORZZA, R. C. et al. New Brazilian floristic list highlights conservation challenges. **Bioscience**, Oxford, v. 62, n. 1, p. 39-45, 2012. Disponível em: < <http://reflora.jbrj.gov.br/downloads/FUNG1.pdf>>. Acesso em: 29 out. 2019.

FURTADO, A. A. et al. Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (Convolvulaceae) leaves and its phenolic compound have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 192, p. 225 – 235, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27448455>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophage in inflammations. **Current Drug Targets - Inflammation & Allergy**, Sharjah, v. 4, p. 281 – 286, 2005. Disponível em: < <http://www.eurekaselect.com/90593/article>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

GEISSMANN, F. et al. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. **Science**, [S.l.], v. 327, n. 5966, p. 656 – 661, 2010.

GONÇALVES, A.E.S.S.; LAJOLO, F.M.; GENOVESE, M.I. Chemical composition and antioxidant/antidiabetic potential of brazilian native fruits and commercial frozen pulps. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.58, n.8, p.4666–4674, 2010.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, [S.l.], v. 126, p. 131-138, 1982. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7181105>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

HUANG, E.; WELLS, C. A. The ground state of innate immune responsiveness is determined at the interface of genetic, epigenetic, and environmental influences. **Journal Immunology**, [S.l.], n. 193, p. 13–19, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24951823>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

JO, W. S. et al. *In vitro* and *in vivo* anti-inflammatory effects of pegmatite. **Molecular & Cellular Toxicology**, [S.l.], v. 6, p. 195 – 202, 2010. Disponível em: < <https://link.springer.com/article/10.1007/s13273-010-0027-0>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

KIM, G. T. et al. Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona muricata* (Graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 Macrophages. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [S.l.], v. 2016, p. 1-10, 2016. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28096884>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

KIM, K. et al. Effect of valproic acid on acute lung injury in a rodent model of intestinal ischemia reperfusion, **Resuscitation**, [S.l.], v. 83, n. 2, p. 243–248, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21824465>>. Acesso em: 15 nov. 2019.



- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, Belo Horizonte, v. 1, n. 1, p. 147-155, jul. 2005. Disponível em: < [https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Texto\\_Adicional\\_ConservacaoID-xNOKMLsupY.pdf](https://www.agencia.cnptia.embrapa.br/recursos/Texto_Adicional_ConservacaoID-xNOKMLsupY.pdf)>. Acesso em: 15 jul. 2019.
- KUMAR, S.; JACK, R. Origin of monocytes and their differentiation to macrophages and dendritic cells. **Journal of endotoxin research**, [S.l.], v. 12, n. 5, p. 278 – 284, 2006.
- LAGE, G. A. **Isolamento, Identificação química e bioprospecção de metabólitos secundários nas folhas de *Annona crassiflora* Mart.** 2011. Dissertação (Mestrado) - Instituto de Ciências Exatas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2011. Disponível em: < [https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3720/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_IsolamentoBiomonitoradoAtivos.pdf](https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3720/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_IsolamentoBiomonitoradoAtivos.pdf)>. Acesso em: 14 ago. 2019.
- LAGO, J. H. G. et al. Structure-activity association of flavonoids in lung diseases. **Molecules**, [S.l.], v. 19, n. 3, p. 3570–3595, 2014. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24662074>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- LEITE, F. C. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do alcaloide curina em modelos experimentais de inflamação aguda e nocicepção.** 2012. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2012. Disponível em: < <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/tede/6780>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. Anti-inflammatory effect of triterpene 3 $\beta$ , 6 $\beta$ , 16 $\beta$ -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, [S.l.], v. 142, p. 59-64, 2012. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22575213>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- LORENZI, H.; MATOS, F. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002.
- MACHADO, A. R. T. et al. Nematicidal activity of *Annona crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasites & vectors**, [S.l.], v. 8, n. 1, p. 113, 2015. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885032>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- MESQUITA, M. L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, Amsterdã, v. 123, p. 439 - 445. 2009. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19501276>>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- MESQUITA, M. L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. Rio de Janeiro: **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, [São Paulo], v. 100, p. 783-787, 2005. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0074-02762005000700019](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762005000700019)>. Acesso em: 15 nov. 2019.
- MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots revisited: earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions.** Mexico: CEMEX; Agrupación Sierra Madre, 2004.
- MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of three fruit species from the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 41, n. 3, p. 1-8, 2019. Disponível em: <

[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-29452019000300901](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452019000300901)>.  
Acesso em: 15 nov. 2019.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, [S.l.], vol. 74, n. 4, p. 418 - 425, 2001. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11566638>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

OLIVEIRA, C. C. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. In mice. **Springer International Publishing**, New York, v. 27, p. 397 – 408, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29372359>. Acesso em: 28 ago. 2019.

OMENA, M. C. et al. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresource Technology**, [S.l.], v. 98, n. 13, p. 2549-2556, 2007. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17137781>. Acesso em: 13 jan. 2019.

PAN, S. et al. New perspectives on how to discover drugs from herbal medicines: CAM's outstanding contribution to modern therapeutics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, [London], vol. 2013, p. 1 - 25, 2013. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/ecam/2013/627375/>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

PATIL, K. R. et al. Animal Models of inflammations for Screening of Anti-inflammatory and development of phytopharmaceuticals. **International Journal of Molecular Sciences**, [S.l.], v. 20, p. 1 -38, 2019. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31491986>>. Acesso em: 28 ago. 2019.

PIMENTA, L. P. S.; GARCIA G. M.; VALE, G. S. G. *In vivo* antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Natural Product Research**, [S.l.], v. 28. p. 1254–1259, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24678811> >. Acesso em: 15 nov. 2019.

PIRES, A. F. Inhibitory effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin in rat acute models of inflammation. **Annals of the Brazilian Academy of Sciences**, Rio de Janeiro, v. 91, n. 2, 2019. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0001-37652019000300706](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652019000300706)>. Acesso em: 15 nov. 2019.

PORTH, C. M. **Essentials of Pathophysiology: concepts of altered health states**. Philadelphia, v. 1280, 2010.

RASCHKE, W. C. et al. Functional macrophage cell lines transformed by Abelson leukemia virus. **Cell**, [S.l.], v. 15, n. 1, p. 261-267, 1978. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/212198>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

RAYNAUD-LE, G. S. et al. *In vitro* antileishmanial activity of acetogenins from Annonaceae. **Biomed Pharmacotherapy**, Amsterdã, v. 58, p. 388-392, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15271421>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

RIBEIRO, I. C. O. et al. Plants of the Cerrado with antimicrobial effects against *Staphylococcus spp.* and *Escherichia coli* from cattle. **BioMed Central**, London, v. 14. n. 32,

p. 1 – 10. 2018. Disponível em: <

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5791213/>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

ROCHA, R. S. et al. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potencial and descriptions of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharmaceutical Biology**, [S.l.], p. 1 – 13, 2015. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25885939>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

SANTANA, F. P. R. et al. Evidences of herbal medicina-derived natural products effects in inflammatory lung diseases. **Hindawi Publishing Corporation**, London, v. 2016, p. 1 -14, 2016. Disponível em: < <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/2348968/>>. Acesso em: 24 ago. 2019.

SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. G. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. **Phytomedicine**, [Amsterdã], v. 8, p. 115 – 120, 2001. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11315753>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

SANTOS, S. S. et al. Anti-inflammatory activy of herb products from *Licania rigida* Benth. **Complementary Therapies in Medicine**, [S.l.], v. 45, p. 254 – 261, 2019. Disponível em: <  
Acesso em 15 nov. 2019.

SAVILL, J. S.; HENSON, P. M.; HASLETT, C. Phagocytosis of aged human neutrophils by macrophages in mediated by a novel “charge-sensitive” recognition mechanism. **The Journal of clinical investigations**, v. 84, n. 5, p. 1518 – 1527, 1989.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira Cineantropometria e Desempenho Humano**, [S.l.], 2011, v. 13, p. 320–328.

SILVA, J. C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract of *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) in rodents. **BioMed Central Complementary & Alternative Medicine**, London, v. 15, n. 197, p. 1 – 10, 2015. Disponível em: <  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26104689>>. Acesso em: 14 nov. 2019.

SMITH, L. S.; LIZA, M. Murine RAW 264.7 cell line as an immune target: are we missing something?. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, [S.l.], v. 39, n. 2, p. 55 – 58, 2017. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28152640>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

SOARES, F. P. et al. **Marolo**: uma frutífera nativa do Cerrado. Lavras: Universidade Federal de Lavras, v. 82, p. 1 – 17, 2009. Disponível em:  
<<http://livraria.editora.ufla.br/upload/boletim/tecnico/boletim-tecnico-82.pdf>>. Acesso em: 10 ago. 2019.

SOFIADIYA, M. O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extract of *Alofia barteri*. **Revista Brasileira de Farmacologia**, [S.l.], v. 24, p. 348 – 354, 2014. Disponível em: < [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-695X2014000300348](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2014000300348)>. Acesso em: 15 nov. 2019.

SOUSA, L. P. et al. PDE4 inhibition drives resolution of neutrophilic inflammations by inducing apoptosis in a PKA-PI3K/Akt-dependent and NF-kappaB-independent manner. **Journal of leukocyte biology**, [S.l.], v. 87, n. 5, p. 895 – 904, 2010.

THAO, N. P. et al. Chemical constituents of *Milium balansae* and inhibition of nitric oxide production on lipopolysaccharide-induced RAW 264.7. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, [S.l.], v. 25, n. 18, p. 3859 – 3863, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26238320>>. Acesso em: 27 out. 2019.

TSIKAS, D. Analysis of nitrite and nitrate in biological fluids by assays based on the Griess reaction: appraisal of the Griess reaction in the L-arginine/nitric oxide area of research. **Journal of Chromatography B: analytical technologies in the biomedical and life sciences**, [S.l.], v. 851, p. 51 – 70, 2006. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16950667>>. Acesso em: 15 nov. 2019.

UGOLINE, B. C. A. **Isolamento biomonitorado de ativos tóxicos das folhas de *Annona crassiflora* Mart. e eficácia antimalárica do alcaloide norestefalagina em nanoemulsões**. 2012. Tese (Mestrado) – Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2012. Disponível em: <[https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3720/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_IsolamentoBiomonitoradoAtivos.pdf](https://www.repositorio.ufop.br/bitstream/123456789/3720/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_IsolamentoBiomonitoradoAtivos.pdf)>. Acesso em: 15 nov. 2019.

WOTHERSPOON, F. et al. The contribution of nitric oxide and vasodilatory prostanoids to bradykinin-mediated vasodilation in Type 1 diabetes. **Diabetic Medicine**, [S.l.], v. 22, n. 6, p. 697 – 702, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15910619>>. Acesso em: 27 out. 2019.

YEO, D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity and phytochemical screening of *Annona senegalensis* leaves. **Therapie**, [S.l.], v. 66, p. 73–80, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21466781>>. Acesso em: 15 nov. 2019.