



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Compostos fenólicos da casca dos frutos de *Annona crassiflora* com
propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes em
modelos *in vitro* e *in vivo***

Aluno: Allisson Benatti Justino

Orientador: Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dr^a. Cássia Regina Silva

UBERLÂNDIA - MG
2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Compostos fenólicos da casca dos frutos de *Annona crassiflora* com
propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes em
modelos *in vitro* e *in vivo***

Aluno: Allisson Benatti Justino

Orientador: Dr. Foued Salmen Espindola

Co-Orientador: Dr^a. Cássia Regina Silva

**Tese apresentada à Universidade
Federal de Uberlândia como
parte dos requisitos para
obtenção do Título de Doutor em
Genética e Bioquímica (Área
Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG
2021**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

J96	Justino, Allisson Benatti, 1992-
2021	Compostos fenólicos da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i> com propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes em modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> [recurso eletrônico] / Allisson Benatti Justino. - 2021.
<p>Orientador: Foued Salmen Espindola. Coorientadora: Cássia Regina Silva. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Uberlândia, Pós-graduação em Genética e Bioquímica. Modo de acesso: Internet. Disponível em: http://doi.org/10.14393/ufu.te.2021.63 Inclui bibliografia.</p>	
<p>1. Genética. I. Espindola, Foued Salmen, 1957-, (Orient.). II. Silva, Cássia Regina, 1984-, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV. Título.</p>	
CDU: 575	

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:

Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091



ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica			
Defesa de:	Doutorado Acadêmico, 06/2020 - PPGGB.			
Data:	Vinte e nove de janeiro de dois mil e vinte e um.	Hora de início:	08:30h	Hora de encerramento: preencher 12:20
Matrícula do Discente:	11623GBI004			
Nome do Discente:	Allisson Benatti Justino			
Título do Trabalho:	Casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i> como fonte de compostos fenólicos com propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias e efeitos antioxidantes contra o estresse oxidativo e nitrosativo.			
Área de concentração:	Bioquímica			
Linha de pesquisa:	Estrutura e função de proteínas.			
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Plantas medicinais, frutos do Cerrado e Diabetes Mellitus.			

Aos vinte e nove dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e um, às 08:30 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Google Meet*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Profª. Drª. Silvana Maria Zucolotto Langassner, Profª. Drª. Sara Marchesan de Oliveira, Prof. Dr. Luiz Ricardo Goulart Filho, Profª. Drª. Celina Monteiro da Cruz Lotufo e Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, orientador (a) do (a) candidato (a) e demais convidados presentes conforme lista de presença. Iniciando os trabalhos o (a) presidente da mesa, Prof. Dr. Foued Salmen Espíndola, apresentou a Comissão Examinadora e o (a) candidato (a), agradeceu a presença do público, e concedeu o (à) Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do (a) Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica. A seguir o (a) senhor (a) presidente concedeu a palavra, pela ordem sucessivamente, aos examinadores, que passaram a arguir o (a) candidato (a). Ultimada a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais. Em face do resultado obtido, a Banca Examinadora considerou o candidato (a):

APROVADO

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Foued Salmen Espíndola, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/01/2021, às 12:20, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Luiz Ricardo Goulart Filho, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/01/2021, às 12:21, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sara Marchesan de Oliveira, Usuário Externo**, em 29/01/2021, às 12:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Silvana Maria Zucolotto Langassner, Usuário Externo**, em 29/01/2021, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Celina Monteiro da Cruz Lotufo, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/01/2021, às 15:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **2532508** e o código CRC **605552B7**.

Dedicatória

Dedico esta tese a minha família, pois a minha formação como profissional não poderia ter sido consolidada sem a ajuda de meus pais que, no decorrer da minha vida, proporcionaram-me, além de carinho e amor, os conhecimentos da integridade, da perseverança e da honestidade.

Aos meus amigos, professores e orientadores que estiveram ao meu lado durante todo o percurso de minha vida acadêmica e que sempre me ofereceram apoio incondicional e tornaram este caminho mais fácil de ser percorrido.

E a todos que acreditam na Ciência.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pela oportunidade de estar realizando este trabalho.

Aos meus pais Fernando e Karina, irmãos Murilo e Bruno, Edson e toda a minha família, e amigos, Ruan Carlos, Vitor Calábria, Flávia Pineli, pelo incentivo e carinho, principalmente nos momentos de dificuldade, e por estarem comigo nesta jornada tornando-a mais fácil e agradável.

Ao Prof. Dr. Foued Salmen Espindola, pela oportunidade oferecida, orientação deste trabalho de Tese e seu grande desprendimento no meu desenvolvimento profissional. À Profa. Dra. Cássia Silva pela oportunidade oferecida pela e co-orientação no desenvolvimento deste trabalho.

Aos integrantes do Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular da UFU, M.^e Rodrigo Franco, M.^a Mariana Pereira, M.^a Danielle Vilela, Dr. Leonardo Peixoto, Dra. Renata Teixeira, Dr. André Saraiva, M.^a Adriele de Souza, M.^e Douglas Caixeta, Heitor Cappato, Júlia Queiroz, Camila Natalli, Mariane Muraoka, Letícia Afonso, Joed Junior, Natália Tavernelli, pela supervisão metodológica, apoio, ajuda na realização dos experimentos, interpretação dos resultados e amizade; ao Instituto de Genética e Bioquímica da UFU e órgãos de fomento, FAPEMIG, CNPq e CAPES, com o fornecimento de material e apoio financeiro para a realização deste trabalho; à banca examinadora, ao curso de graduação em Biotecnologia da UFU e ao curso de pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU.

À todos vocês, o meu muito obrigado.

Resumo

A casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart., uma espécie nativa do Cerrado brasileiro, é uma fonte de compostos fenólicos com alta capacidade antioxidant. Este estudo teve como objetivo investigar as possíveis propriedades antinociceptivas, anti-inflamatórias e antioxidantes de frações ricas em polifenóis da casca dos frutos de *A. crassiflora* em modelos *in vitro* e *in vivo*. Citocinas pró-inflamatórias e a produção de óxido nítrico (NO) foram avaliadas em macrófagos ativados por LPS. A fração acetato de etila, por ser capaz de reduzir a produção de mediadores inflamatórios nos macrófagos, foi administrada por via oral em camundongos C57BL/6/J, e os animais foram submetidos à nocicepção induzida por glutamato, à inflamação induzida por adjuvante de Freund completo (CFA), e a testes de campo aberto e rotarod para análise do desempenho motor. A fração *n*-butanol, por apresentar a maior capacidade antioxidant entre as frações, foi investigada contra o estresse oxidativo e nitrosativo hepático em ratos Wistar diabéticos induzidos por estreptozotocina. Foram avaliados os parâmetros bioquímicos séricos, o estado oxidativo e nitrosativo hepático, o sistema de defesa da glutatona e os parâmetros farmacocinéticos *in silico* dos principais compostos da fração. Como resultados, foi observado que a fração acetato de etila inibiu a produção de IL-6 e NO nos macrófagos induzidos por LPS nas concentrações de 0,1 e 0,3 µg/mL ($p < 0,001$) e reduziu a nocicepção induzida pelo glutamato em $75 \pm 7\%$ na dose de 30 mg/kg ($p < 0,001$), sem alterar a atividade locomotora dos animais. Além disso, a fração acetato de etila (30 mg/kg) foi capaz de reverter a hiperalgesia aguda e tardia induzida por CFA ($p < 0,05$), além de reduzir o edema na fase aguda ($p < 0,05$), com reduções da atividade da mieloperoxidase ($40 \pm 12\%$, $p < 0,05$) e da infiltração de células inflamatórias polimorfonucleares no tecido da pata ($40 \pm 9\%$, $p < 0,001$). O tratamento dos ratos diabéticos com a fração *n*-butanol durante 30 dias, na dose de 50 mg/kg, diminuiu as atividades séricas de alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase e fosfatase alcalina ($p < 0,01$), além de reduzir no fígado a peroxidação lipídica, a carbonilação e nitração de proteínas, o nível de óxido nítrico sintase induzível e as atividades e expressões de glutatona peroxidase, superóxido dismutase e catalase ($p < 0,05$). Houve também aumentos na capacidade antioxidant, na

atividade da glutatona redutase e no nível de glutatona reduzida ($p < 0,05$). As previsões *in silico* dos compostos fenólicos presentes na fração mostraram absorção e distribuição favoráveis, sem possíveis sinais de hepatotoxicidade. Os resultados apoiam os efeitos antinociceptivos, anti-inflamatórios e hepatoprotetores da casca do fruto de *A. crassiflora*, e sugerem que esses efeitos são desencadeados pela supressão de citocinas pró-inflamatórias, redução da infiltração de neutrófilos, e melhoria dos parâmetros oxidativos/nitrosativos hepático.

Palavras-chave: Annonaceae, antioxidante, araticum, estresse oxidativo, fígado, inflamação.

Abstract

The fruit peel of *Annona crassiflora* Mart., a species native to the Brazilian Cerrado, is a source of phenolic compounds with high antioxidant capacity. This study aimed to investigate the possible antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant properties of fractions rich in polyphenols from the *A. crassiflora* fruit peels in *in vitro* and *in vivo* models. Proinflammatory cytokines and nitric oxide (NO) production were evaluated in LPS-activated macrophages. The ethyl acetate fraction, being able to reduce the production of inflammatory mediators in macrophages, was administered orally in C57BL/6J mice, and the animals were subjected to glutamate-induced nociception, Freund's adjuvant (CFA)-induced inflammation, and open field and rotarod tests for motor performance analysis. The n-butanol fraction, which showed the highest antioxidant capacity among the fractions, was investigated against hepatic oxidative and nitrosative stress in diabetic Wistar rats induced by streptozotocin. Serum biochemical parameters, hepatic oxidative and nitrosative status, glutathione defense system and *in silico* pharmacokinetic parameters of the main compounds of the fraction were evaluated. As results, the ethyl acetate fraction inhibited IL-6 and NO production in LPS-induced macrophages at concentrations of 0.1 and 0.3 µg/mL ($p < 0.001$) and reduced glutamate-induced nociception by $75 \pm 7\%$ at the dose of 30 mg/kg ($p < 0.001$), without changing the locomotor activity of the animals. In addition, the ethyl acetate fraction (30 mg/kg) was able to reverse the CFA-induced acute and late hyperalgesia ($p < 0.05$), in addition to reducing edema in the acute phase ($p < 0.05$), with reductions in myeloperoxidase activity ($40 \pm 12\%$, $p < 0.05$) and inflammatory polymorphonuclear cell infiltration in the paw tissue ($40 \pm 9\%$, $p < 0.001$). The treatment of diabetic rats with the *n*-butanol fraction for 30 days, at the dose of 50 mg/kg, decreased the serum activities of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase ($p < 0.01$), in addition to reducing in the hepatic lipid peroxidation, protein carbonylation and nitration, the level of inducible nitric oxide synthase and the activities and expressions of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase ($p < 0.05$). There were also increases in antioxidant capacity, glutathione reductase activity and reduced

glutathione level ($p < 0.05$). The *in silico* predictions of the phenolic compounds present in the fraction showed favorable absorption and distribution, without possible signs of hepatotoxicity. The results support the antinociceptive, anti-inflammatory and hepatoprotective effects of *A. crassiflora* fruit peel, and suggest that these effects are triggered by the suppression of pro-inflammatory cytokines, reduction of neutrophil infiltration, and improvement of hepatic oxidative/nitrosative parameters.

Keywords: Annonaceae, antioxidant, araticum, oxidative stress, liver, inflammation.

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

AcEt	Fração acetato de etila da casca do fruto de <i>Annona crassiflora</i>
ADMET	Absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade
AGEs	Produtos finais de glicação avançada (do inglês <i>advanced glycation end-products</i>)
ALP	Fosfatase alcalina
ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
AP-1	Proteína ativadora 1, do inglês <i>activator protein 1</i>
ARRIVE	Do inglês <i>animal research: reporting of in vivo experiments</i>
AST	Aspartato aminotransferase
BMDM	Macrófagos derivados da medula óssea (do inglês <i>bone marrow-derived macrophages</i>)
C.T.E.	Cadeia transportadora de elétrons
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de ética na utilização de animais
CFA	Adjuvante completo de Freund (do inglês <i>complete Freund's adjuvant</i>)
CH ₂ Cl ₂	Fração diclorometano da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i>
CLAE-ESI-EM	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CYP	Enzimas do citocromo p
D	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina
D100	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 100 mg/kg/dia da fração <i>n</i> -butanol da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i>

D25	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 25 mg/kg/dia da fração <i>n</i> -butanol da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i>
D50	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 50 mg/kg/dia da fração <i>n</i> -butanol da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i>
DI	Ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 2 unidades de insulina por dia
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DNP	2,4-dinitrofenil
DNPH	2,4-dinitrofenilhidrazina
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial (do inglês, <i>endothelial nitric oxide synthase</i>)
EUA	Estados Unidos da América
FRAP	Poder antioxidante redutor férreo (do inglês <i>ferric reducing antioxidant power</i>)
G6PDH/Glc6PDH	Glicose 6-fosfato desidrogenase
GPx	Glutatona peroxidase
GR	Glutatona redutase
GSH	Glutatona reduzida
GS-SG	Glutatona oxidada
h	Horas
HDL	Lipoproteína de alta densidade (do inglês <i>high density lipoprotein</i>)
HE	Hematoxilina-eosina
IC ₅₀	Metade da concentração inibitória máxima
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível (do inglês <i>inducible nitric oxide synthase</i>)
ipl	Intraplantar

Km ²	Quilômetros ao quadrado
LD50	Toxicidade aguda por via oral
LOAEL	Toxicidade crônica por via oral
LPS	Lipopolissacarídeo
M-CSF	fator estimulador de colônias de macrófagos (do inglês <i>macrophage colony stimulating factor</i>)
MDA	Malondialdeído
min	Minutos
MPO	Mieloperoxidase
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
<i>n</i> -But	Fração <i>n</i> -butanol da casca dos frutos de <i>Annona crassiflora</i>
ND	Ratos não diabéticos
NF-κB	Fator nuclear kappa B, do inglês <i>nuclear factor kappa B</i>
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO/ [·] NO	Óxido nítrico (do inglês <i>nitric oxide</i>)
N-Tir	Nitrotirosina
ORAC	Capacidade de absorção dos radicais oxigenados (do inglês <i>oxygen radical absorbance capacity</i>)
PBS	Tampão fosfato salino
RNS	Espécies reativas de nitrogênio (do inglês <i>reactive nitrogen species</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (do inglês <i>reactive oxygen species</i>)
s	Segundos
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio
SOD	Superóxido dismutase
STZ	Estreptozotocina
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (do inglês <i>thiobarbituric acid reactive substances</i>)
TNF-α	Fator de necrose tumoral α (do inglês <i>tumor necrosis factor α</i>)

TPTZ	2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina
UFU	Universidade Federal de Uberlândia
V	Veículo
Vdss	Volume de distribuição no estado estacionário
γ -GT	γ -glutaryltransferase

Sumário

1.	Introdução.....	1
1.1.	Frutos do Cerrado	1
1.2.	Compostos fenólicos	3
1.3.	<i>Annona crassiflora</i> Mart.	5
1.4.	Dor e inflamação	12
1.5.	Diabetes <i>mellitus</i>	13
1.6.	Estresse oxidativo e nitrosativo.....	16
2.	Objetivos.....	18
2.1.	Objetivo geral	18
2.2.	Objetivos específicos.....	18
3.	Materiais e métodos	20
3.1.	Reagentes	20
3.2.	Material vegetal	20
3.3.	Geração de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)	21
3.4.	Análise da produção de NO, IL-6 e TNF- α	21
3.5.	Modelo de nocicepção e inflamação.....	22
3.5.1.	Animais	22
3.5.2.	Nocicepção induzida por glutamato	22
3.5.3.	Dor inflamatória induzida por CFA	23
3.5.3.1.	Nocicepção mecânica	23
3.5.3.2.	Nocicepção espontânea	24
3.5.3.3.	Nocicepção a frio.....	24
3.5.3.4.	Edema da pata	24
3.5.3.5.	Infiltração de neutrófilos	25
3.5.3.6.	Análises histológicas	25
3.5.4.	Testes de campo aberto e rotarod	25
3.6.	Modelo de estresse oxidativo e nitrosativo	26
3.6.1.	Animais	26
3.6.2.	Indução do diabetes por estreptozotocina	26
3.6.3.	Grupos e tratamento.....	27
3.6.4.	Parâmetros bioquímicos séricos	27

3.6.5.	Coleta das amostras e preparação dos tecidos	28
3.6.6.	Níveis dos biomarcadores antioxidantes no fígado	28
3.6.6.1.	Capacidade antioxidant total	28
3.6.6.2.	Peroxidação lipídica	28
3.6.6.3.	Carbonilação proteica.....	29
3.6.6.4.	Nível de glutationa reduzida (GSH).....	29
3.6.7.	Atividade das enzimas antioxidantes	29
3.6.7.1.	Atividade da superóxido dismutase (SOD)	30
3.6.7.2.	Atividade da catalase (CAT).....	30
3.6.7.3.	Atividade da glutationa peroxidase (GPx).....	30
3.6.7.4.	Atividade da glutationa redutase (GR)	30
3.6.7.5.	Atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH).....	31
3.6.8.	Expressão dos biomarcadores proteicos do estresse oxidativo	31
3.6.9.	Análises histológicas	32
3.7.	Predição das propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	32
3.8.	Análises estatísticas	32
4.	Resultados.....	33
4.1.	Rendimento da extração	33
4.2.	Efeito das frações nos níveis de NO, IL-6 e TNF- α	33
4.3.	Propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da fração acetato de etila da casca dos frutos de <i>A. crassiflora</i>	35
4.3.1.	Efeito da fração acetato de etila na nocicepção induzida por glutamato	35
4.3.2.	Efeito da fração acetato de etila na dor inflamatória.....	36
4.3.3.	Efeito da fração acetato de etila na inflamação induzida por CFA	38
4.3.4.	Coordenação motora nos testes de campo aberto e rotarod	41
4.4.	Propriedades hepatoprotetoras da fração <i>n</i> -butanol da casca dos frutos de <i>A. crassiflora</i> contra o estresse oxidativo e nitrosativo induzido pelo diabetes	41
4.4.1.	Massa corpórea e parâmetros glicêmicos.....	41
4.4.2.	Parâmetros bioquímicos séricos	42
4.4.3.	Análise dos marcadores de estresse oxidativo	43
4.4.4.	Análise dos marcadores de estresse nitrosativo.....	48
4.4.5.	Análise histológica	49
4.5.	Predição das propriedades farmacocinéticas <i>in silico</i>	51

5.	Discussão	52
6.	Conclusão.....	63
7.	Referências	63
	Anexos.....	92

1. Introdução

1.1. Frutos do Cerrado

Os produtos naturais têm sido utilizados na medicina tradicional para tratar doenças e patologias há milhares de anos, na forma de medicamentos tradicionais, remédios, poções e óleos, muitos destes derivados de plantas (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012). Dentre os produtos naturais, têm-se as plantas medicinais, sendo que, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, entre 65% e 80% das populações dos países em desenvolvimento atualmente utilizam-nas como remédios (PALHARES; GONÇALVES DRUMMOND; DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL *et al.*, 2015).

Está bem documentado que os produtos naturais desempenharam papéis críticos no desenvolvimento de medicamentos modernos, especialmente para agentes antibacterianos e antitumorais (VEERESHAM, 2012). Embora a popularidade dos produtos sintéticos tenha aumentado devido ao seu custo de produção, eficácia no tempo, fácil controle de qualidade, regulamentação rigorosa e efeitos rápidos, sua segurança e eficácia sempre permaneceram questionáveis, resultando na dependência dos produtos naturais em mais de 80% da população total no mundo em desenvolvimento, devido à sua segurança e eficácia comprovadas pelo tempo (DIAS; URBAN; ROESSNER, 2012; VEERESHAM, 2012). Um grande número de compostos derivados de produtos naturais em vários estágios de desenvolvimento clínico destacou a viabilidade existente e a importância do uso de produtos naturais como fontes de novos candidatos a medicamentos.

O primeiro produto natural puro comercial introduzido para uso terapêutico foi a morfina, comercializada pela Merck em 1826, e a primeira droga semissintética pura foi a aspirina, com base no produto natural salicina isolada de *Salix alba*, introduzida pela Bayer em 1899 (VEERESHAM, 2012). A partir disso, ocorreu o isolamento de outras drogas, como cocaína, codeína, digitoxina, quinina e pilocarpina, das quais algumas ainda estão em uso, e vários outros compostos derivados de plantas que foram desenvolvidos e comercializados como drogas, tais como o paclitaxel, da planta *Taxus brevifolia*, para câncer de pulmão, de

ovário e de mama, artemisinina, da planta tradicional chinesa *Artemisia annua*, para combater a malária multirresistente, silimarina, extraída das sementes de *Silybum marianum* para o tratamento de doenças do fígado (VEERESHAM, 2012).

A flora diversificada do Brasil representa um grande potencial para o fornecimento de espécies ricas em compostos bioativos com inúmeras aplicações na fabricação de cosméticos, agroquímicos, aditivos alimentares e, especialmente, produtos farmacêuticos (DE OMENA; NAVARRO; DE PAULA *et al.*, 2007). Dentre os recursos vegetais com potencial terapêutico, os frutos do bioma Cerrado (savana brasileira) podem ter maior teor de compostos bioativos e maior atividade antioxidante em comparação com frutos comestíveis convencionais, provavelmente devido a fatores abióticos adversos que estimulam a produção de compostos bioativos, especialmente antioxidantes (BAILÃO; DEVILLA; DA CONCEIÇÃO *et al.*, 2015; JUSTINO; DE MOURA; FRANCO *et al.*, 2020).

O Cerrado é um bioma de savana tropical que cobre 1,8 milhões de Km² do Brasil, o que corresponde a aproximadamente 23% do território brasileiro, sendo detentor de uma grande parte da biodiversidade encontrada no país (DRAGANO; DE VENANCIO; PAULA *et al.*, 2010; MITTERMEIER; DA FONSECA; RYLANDS *et al.*, 2005). Diversas espécies vegetais com alto potencial econômico são encontrados nesse bioma, principalmente por causa da diversidade de árvores frutíferas nativas com elevado valor nutricional e propriedades medicinais (CARAMORI; LIMA; FERNANDES, 2004; RIBEIRO; RODRIGUES, 2006). Um trabalho recente demonstrou o potencial antioxidante e anti-glicante de extratos aquosos e etanólicos obtidos da polpa de frutos do Cerrado, como *Annona crassiflora*, *Brosimum gaudichaudii*, *Butia capitata*, *Byrsonima* sp., *Campomanesia xanthocarpa*, *Caryocar brasiliense*, *Eugenia dysenterica*, *Genipa americana*, *Hancornia speciosa*, *Hymenaea stigonocarpa* e *Mauritia flexuosa* (JUSTINO; DE MOURA; FRANCO *et al.*, 2020). No entanto, muitas espécies vegetais presentes nesse bioma ainda são pouco exploradas.

Dentro deste contexto, faz-se necessário avaliar o potencial farmacológico desses produtos naturais assim como a segurança de uso, para contribuir com o

desenvolvimento de possíveis novos produtos na área da saúde e/ou obtenção de moléculas bioativas.

1.2. Compostos fenólicos

Muitos dos compostos bioativos das plantas são provenientes de metabólitos secundários. Os metabólitos secundários geralmente não são essenciais para o crescimento, desenvolvimento ou reprodução de um organismo, sendo produzidos como resultado de adaptação ao ambiente circundante ou para atuar como um possível mecanismo de defesa contra predadores (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; JEANDROZ; LAMOTTE, 2017). A biossíntese desses metabólitos é derivada dos processos fundamentais da fotossíntese, glicólise e ciclo do ácido cítrico, os quais fornecem intermediários biossintéticos que resultam na formação de metabólitos secundários (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000). Os produtos formados normalmente são armazenados em pequenas quantidades e podem ser divididos de acordo com a sua rota biossintética de origem: terpenoides, compostos nitrogenados (alcaloides, glucosinolatos e cianidrinas) e compostos fenólicos (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000).

Os compostos fenólicos são encontrados em grande parte nos frutos, vegetais, cereais e bebidas, e geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação ultravioleta ou agressão por patógenos (PANDEY; RIZVI, 2009). Todos os compostos fenólicos de plantas surgem de um intermediário comum, a fenilalanina ou um precursor próximo, o ácido chiquímico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). As principais classes incluem ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanas (Figura 1) (PANDEY; RIZVI, 2009).

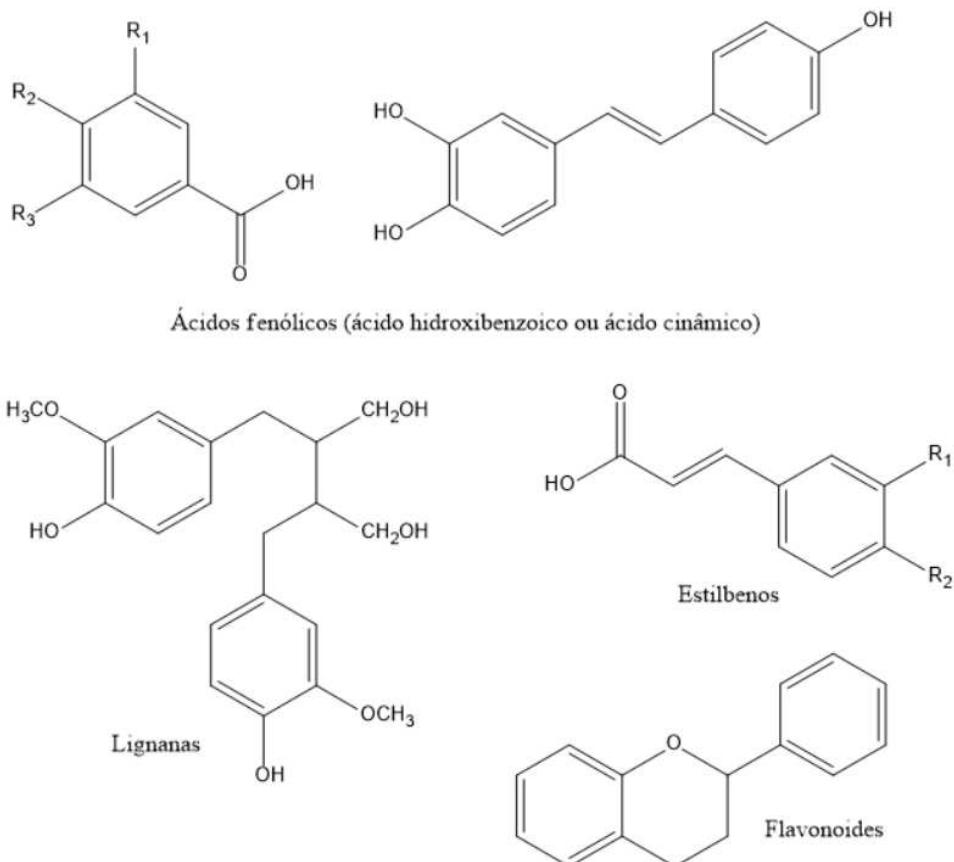


Figura 1: Estruturas químicas dos principais compostos fenólicos: ácidos fenólicos, lignanas, estilbenos e flavonoides. Adaptado de PANDEY e RIZVI (2009).

Os polifenóis têm apresentado diversas propriedades biológicas benéficas à saúde humana, o que os tornam objeto de crescente interesse científico (KUMAR; PANDEY, 2013; PANDEY; RIZVI, 2009). As evidências geradas por estudos em animais e em humanos mostram que as propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias dos polifenóis podem potencialmente prevenir ou servir como tratamento contra muitas doenças não transmissíveis (CORY; PASSARELLI; SZETO *et al.*, 2018). A literatura sugere que o consumo a longo prazo de dietas ricas em polifenóis protege contra certos tipos de câncer, doenças cardiovasculares, diabetes *mellitus* tipo 2, osteoporose, pancreatite, problemas gastrointestinais, danos nos pulmões e doenças neurodegenerativas (BEDEKAR; SHAH; KOFFAS, 2010; CORY; PASSARELLI; SZETO *et al.*, 2018; GRAF; MILBURY; BLUMBERG, 2005; KHAN; LIU; WANG *et al.*, 2020; QAZI; SIDDIQUI;

JAHAN *et al.*, 2018). Muitas dessas propriedades protetoras são atribuídas à capacidade dos polifenóis de neutralizar os radicais livres através da doação de hidrogênio e formar complexos químicos estáveis, impedindo novas reações que possam ser prejudiciais ao organismo, pela quelatação de metais envolvidos no estresse oxidativo ou pela inibição de enzimas envolvidas na geração de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *reactive oxygen species*) (HUANG; OU; PRIOR, 2005; KUMAR; PANDEY, 2013).

O potencial antioxidante dos polifenóis é responsável por proteger o organismo contra o estresse oxidativo e processos inflamatórios, além de regular as ações da resposta imune (ARULSELVAN; FARD; TAN *et al.*, 2016; ARUOMA, 1999; DEY; LAKSHMANAN, 2013; JOHANSEN; HARRIS; RYCHLY *et al.*, 2005). Além disso, estudos têm elucidado efeito da farmacocinética da absorção na eficácia dos polifenóis como antioxidantes e outros mecanismos potencialmente promotores de saúde (SCALBERT; MORAND; MANACH *et al.*, 2002; SCALBERT; RÉMÉSY; MORAND *et al.*, 2004).

Assim, estudos com extratos ricos em compostos fenólicos são promissores no controle do estresse oxidativo e inflamação relacionados a doenças crônicas. Plantas com propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias conhecidas estão recebendo muita atenção, pois acredita-se ter menos efeitos adversos, além de poder melhorar a qualidade de vida dos pacientes quando utilizado de forma complementar ao tratamento padrão (ELOSTA; GHOUSS; AHMED, 2012). Recentemente, foi demonstrado que a casca do fruto de *Annona crassiflora* Mart., um fruto nativo do Cerrado brasileiro, é uma fonte de compostos fenólicos, incluindo flavonoides e proantocianidinas, com propriedades antioxidantes e anti-glicantes *in vitro* (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016), o que a torna um possível objeto de estudo para novos ensaios *in vivo* em modelos de estresse oxidativo e inflamação.

1.3. *Annona crassiflora* Mart.

Annona crassiflora Mart., uma espécie vegetal da família Annonaceae encontrada no Cerrado, tem sido usada para o tratamento de reumatismo, feridas, doenças venéreas, piolhos, mordidas de cobra e infecções microbianas

(ALMEIDA; PROENÇA; RIBEIRO, 1994; ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987; RIBEIRO; WALTER, 1998; SILVA; CERDEIRA; CHAVASCO *et al.*, 2014; VILAR; FERREIRA; FERRI *et al.*, 2008). O fruto da *A. crassiflora* (Figura 2) é popularmente conhecido como araticum, articum, marolo e panã, sendo sua polpa utilizada para a produção de sucos, geleias, doces, sorvetes e licores (ALMEIDA; SILVA; RIBEIRO, 1987).



Figura 2: Fruto araticum da espécie *Annona crassiflora* Mart. Fonte: autor.

Estudos anteriores mostraram várias propriedades biológicas de extratos de diferentes partes dessa espécie. Atividades antioxidantes *in vitro* e *in vivo* de extratos/frações de diferentes partes botânicas de *A. crassiflora* (fruto e planta) foram estudados (ARRUDA; PASTORE, 2019). Extratos hidroetanólicos da polpa e casca do fruto apresentaram alta capacidade antioxidante (ARRUDA; PEREIRA; PASTORE, 2018; JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016; ROESLER; CATHARINO; MALTA *et al.*, 2007). Extratos da semente do fruto araticum também foram capazes de inibir a peroxidação lipídica de microssomas do fígado de ratos (ROESLER; MALTA; CARRASCO *et al.*, 2006). Além disso, ROESLER (2011) mostrou o efeito hepatoprotector de extratos etanólico da casca e sementes do fruto do araticum na prevenção da peroxidação lipídica e manutenção das enzimas antioxidantes hepáticas.

Estudos também têm demonstrado efeitos anti-inflamatórios de extratos e frações do araticum. Extrato metanólico e frações hidroetanólicas das folhas inibiram parâmetros inflamatórios induzidos por carragenina em camundongos,

como edema de pata, atividade da mieloperoxidase e migração de leucócitos (DA COSTA OLIVEIRA; DE MATOS; DE CARVALHO VELOSO *et al.*, 2018; ROCHA; KASSUYA; FORMAGIO *et al.*, 2016). Em um outro estudo realizado em um modelo de cicatrização de feridas *in vivo*, uma formulação contendo frações ricas em polifenóis da casca do fruto foi capaz de reduzir a infiltração de neutrófilos e macrófagos e induzir a síntese de colágeno tipo I e tipo III em feridas cutâneas (DE MOURA; JUSTINO; FERREIRA *et al.*, 2018).

Atividades antitumorais também foram observadas em diversos extratos, frações e compostos isolados da *A. crassiflora*. Crassiflorina, uma acetogenina isolada das sementes do fruto, foi altamente citotóxica para células de carcinoma do pulmão, adenocarcinoma do cólon, carcinoma da mama, melanoma e carcinoma do sistema nervoso central (SANTOS; BOAVENTURA; DE OLIVEIRA, 1994). Extratos hidroetanólico, etanólico, metanólico e hexânico de várias partes da *A. crassiflora*, como casca e madeira da raiz, sementes e folhas, apresentaram propriedades antiproliferativas contra diversas linhagens de células tumorais (glioma, leucemia, carcinoma do cólon, melanoma e linhagens de células de câncer cervical) (DE MESQUITA; DE PAULA; PESSOA *et al.*, 2009; SILVA; ALVES; ROSA *et al.*, 2019). Outro estudo mostrou a propriedade antitumoral *in vivo* de uma fração rica em acetogeninas da madeira de *A. crassiflora*, no qual um pronunciado efeito antitumoral foi observado em camundongos com apenas uma única administração da fração (1,25 mg/kg) por via intratumoral e via intravenosa (PIMENTA; MENDONÇA; PRETTI *et al.*, 2011). Propriedades antimutagênicas das sementes dos frutos, folhas e raízes também foram demonstrados por DRAGANO; DE VENANCIO; PAULA *et al.* (2010) e VILAR; FERREIRA; FERRI *et al.* (2008).

Extratos hidroetanólicos filtrados e precipitados das folhas de *A. crassiflora* também apresentaram efeito antinociceptivo em camundongos (DA COSTA OLIVEIRA; DE MATOS; DE CARVALHO VELOSO *et al.*, 2018). Os resultados deste estudo mostraram que a administração oral de ambas as frações reduziu a resposta inflamatória e a nocicepção induzida por formalina. Outras atividades biológicas também foram demonstradas por extratos obtidos de diferentes partes da planta, ocomo atividades antibacteriana, nematicida e antimalária da folha (MACHADO; FERREIRA; DA SILVA MEDEIROS *et al.*, 2015; PIMENTA;

GARCIA; GONCALVES *et al.*, 2014; TAKAHASHI; PEREIRA; PIMENTA *et al.*, 2006) e ações larvicida e moluscicida da raiz, casca do caule e frutos (DE OMENA; NAVARRO; DE PAULA *et al.*, 2007; DOS SANTOS; SANT'ANA, 2001).

Durante a produção de sucos e alimentos, uma grande quantidade da casca do fruto é descartada. Esses subprodutos geralmente não são utilizados pois possuem um sabor adstringente devido ao alto teor de compostos fenólicos (ROESLER; CATHARINO; MALTA *et al.*, 2007). No entanto, a casca dos frutos de *A. crassiflora* foi recentemente demonstrada por nosso grupo como uma fonte de alcaloides (JUSTINO; BARBOSA; NEVES *et al.*, 2020; PEREIRA; JUSTINO; MARTINS *et al.*, 2017), flavonoides e proantocianidinas (JUSTINO; FRANCO; SILVA *et al.*, 2019; JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016).

Previamente, uma pré-purificação do extrato bruto etanólico da casca dos frutos de *A. crassiflora* foi realizada, com a obtenção de frações não citotóxicas ricas em polifenóis (frações acetato de etila e *n*-butanol) (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). A análise por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrometria de massas com ionização por eletrospray (CLAE-ESI-EM/EM) mostrou a presença de vários compostos fenólicos em ambas as frações acetato de etila e *n*-butanol, como ácido quílico, cafeoil-glicosídeo, (epi)catequina, feruloil-galactosídeo e procianidina B2, enquanto que queracetina-glicosídeo, kaempferol-rutinosídeo, kaempferol-glicosídeo e procianidina C1 foram identificados apenas na fração acetato de etila, e ácido clorogênico na fração *n*-butanol (Figuras 3, 4 e 5).

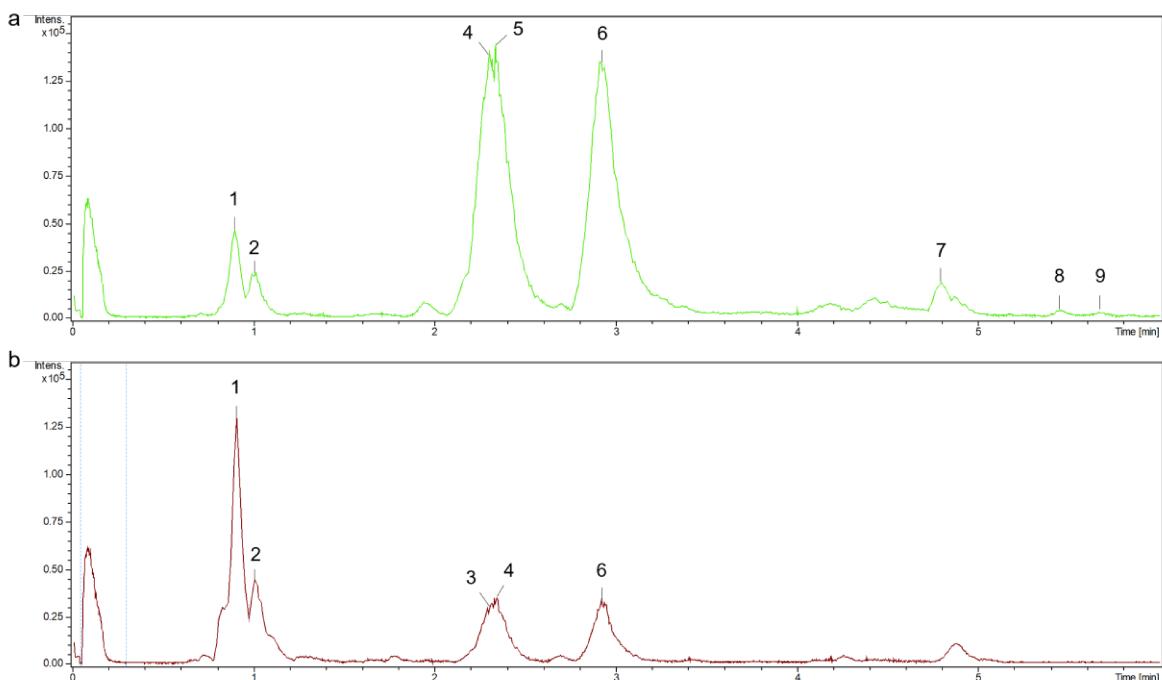


Figura 3: Cromatogramas (CLAE-ESI-EM) das frações acetato de etilo (a) e *n*-butanol (b) do extrato etanólico da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (modo negativo) recentemente publicadas (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). Os números correspondentes aos picos são 1: ácido quínico; 2: cafeoil-glicosídeo; 3: ácido clorogênico; 4: procianidina B2; 5: procianidina C1; 6: epi-catequina; 7: quercetina-glicosídeo; 8: kaempferol-rutinosídeo; 9: kaempferol-glicosídeo.

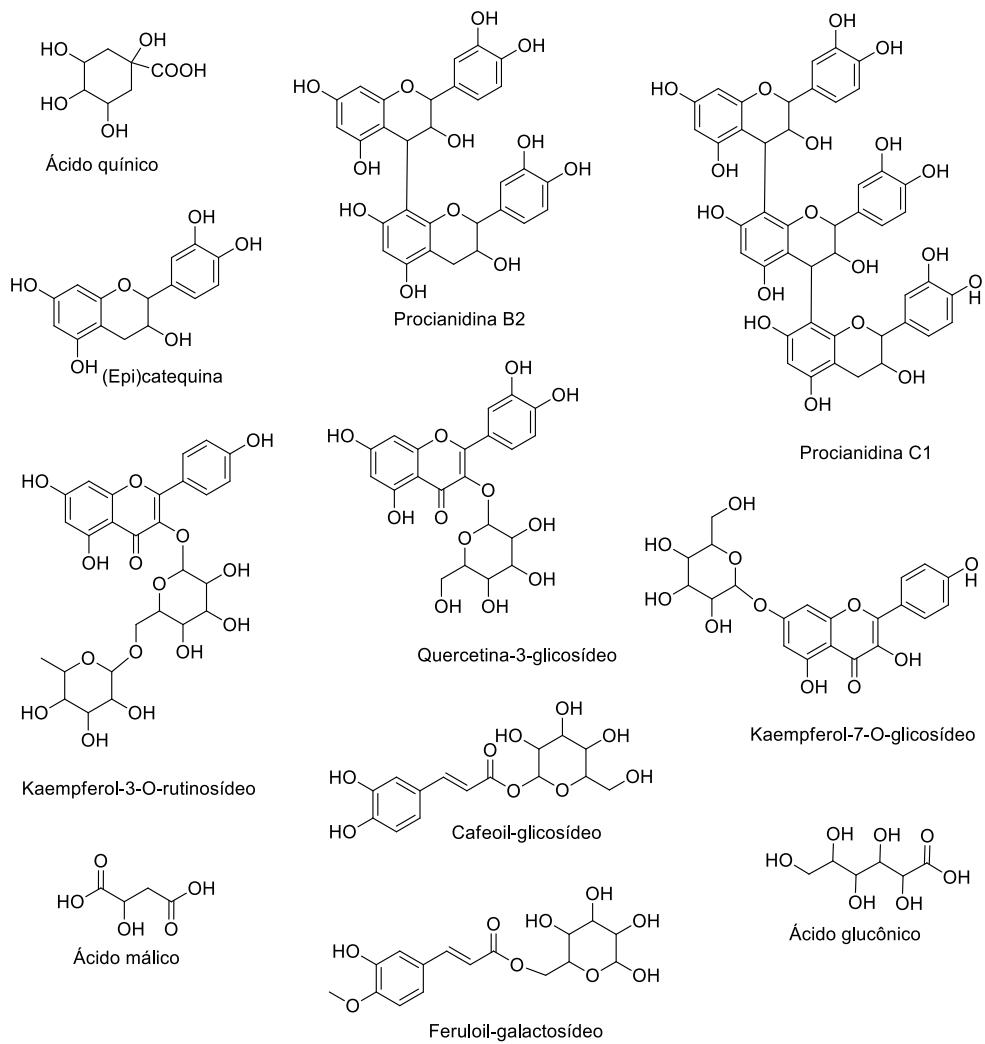


Figura 4: Estruturas químicas das moléculas sugeridas pela análise de CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração acetato de etila do extrato etanólico da casca dos frutos de *Annona crassiflora*.

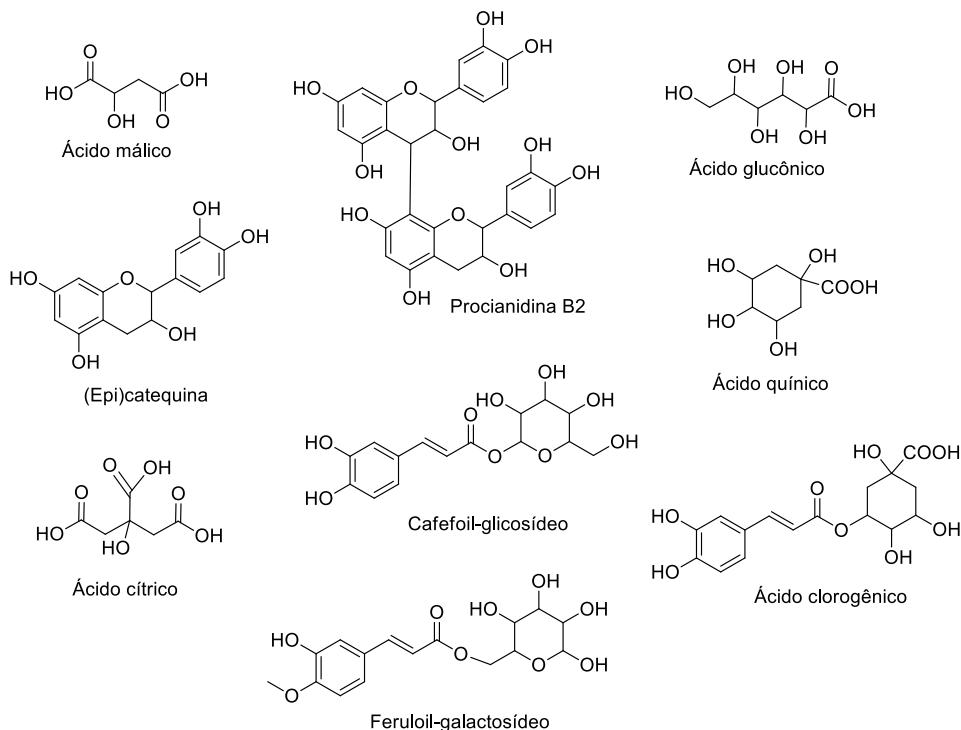


Figura 5: Estruturas químicas das moléculas sugeridas pela análise de CLAE-ESI-EM/EM (modo negativo) da fração *n*-butanol do extrato etanólico da casca dos frutos de *Annona crassiflora*.

Além disso, no mesmo estudo, as frações acetato de etila e *n*-butanol da casca dos frutos de *A. crassiflora* apresentaram alta capacidade antioxidante e potencial inibitório contra hidrolases glicosídicas e glicação não enzimática, o que pode auxiliar no controle da hiperglicemia e complicações relacionadas ao diabetes *mellitus* (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). Além disso, um estudo feito por DE MOURA; JUSTINO; FERREIRA *et al.* (2019) mostrou a capacidade pró-fibrogênica e propriedades anti-inflamatórias das frações acetato de etila e *n*-butanol no reparo tecidual.

Como se espera que indutores antioxidantes e sequestradores de ROS atuem contra o estresse oxidativo e nitrosativo, e tenham ou aumentem as atividades anti-hiperalgésica e anti-inflamatória (SINGH; VINAYAK, 2015), decidimos investigar os efeitos das frações ricas em polifenóis da casca dos frutos de *A. crassiflora* em modelos experimentais *in vivo* de dor inflamatória aguda e tardia, e de diabetes *mellitus*, uma vez que o estresse oxidativo tem sido reportado como resultado da hiperglicemia.

1.4. Dor e inflamação

A dor é a queixa mais comum na área médica, o que prejudica a qualidade de vida de muitos pacientes (KING; FRASER, 2013). A literatura define dor como uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano real ou potencial ao tecido”, alertando o sistema contra estímulos nocivos, sendo classificada em dor nociceptiva, dor inflamatória e dor neuropática (LOESER; TREEDDE, 2008). A hiperalgesia mecânica é um aumento da sensibilidade à dor que pode ser produzido por estímulos mecânicos, sendo característica de dor patológica (RAKEL; VANCE; ZIMMERMAN *et al.*, 2015). A inflamação articular é uma das causas de dor inflamatória patológica sensível ao estímulo mecânico (RAKEL; VANCE; ZIMMERMAN *et al.*, 2015). As desordens inflamatórias como as artrites estão entre as situações crônicas que mais frequentemente afetam a população mundial e têm um forte impacto na qualidade de vida, no uso de recursos e de cuidados médicos, e na economia de um país (BRENNAN-OLSEN; COOK; LEECH *et al.*, 2017).

Na artrite, os nervos articulares tornam-se sensibilizados, produzindo dor aguda e crônica (VON BANCHET; RICHTER; HUCKEL *et al.*, 2007). O desenvolvimento de artrite inflamatória nas articulações envolve a migração de células T patogênicas ativadas dos tecidos linfoides periféricos para o tecido articular (tecido sinovial), que é mediada principalmente por um processo quimiotático (GUO; WANG; XU *et al.*, 2018). Essas células T iniciam atividades destrutivas das articulações secretando citocinas e outros mediadores, que proporcionam um ambiente inflamatório que atrai outros tipos de células, como neutrófilos, macrófagos e fibroblastos, para o local. Assim, diversas moléculas, tais como interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tumoral α (TNF-α, do inglês *tumor necrosis factor α*) e NO têm implicações na destruição local do tecido durante o progresso da artrite (JIANG; HE; YANG *et al.*, 2014; NAGY; KONCZ; TELARICO *et al.*, 2010). Em alguns casos, danos à cartilagem e ao osso podem causar destruição das articulações (GUO; WANG; XU *et al.*, 2018). O uso de adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *complete Freund's adjuvant*) tem sido empregado como um modelo de roedor para estudar novas terapias para a dor inflamatória (OLIVEIRA; SILVA; WENTZ *et al.*, 2014; VON

BANCHET; RICHTER; HUCKEL *et al.*, 2007; WANDJI; BOMBA; NKENG-EFOUET *et al.*, 2018).

O tratamento da dor inflamatória consiste principalmente no uso de anti-inflamatórios não esteroidais, corticosteroides e analgésicos como opioides (EMERY, 2006; GUO; WANG; XU *et al.*, 2018; KHANNA; JAISWAL; GUPTA, 2017; LEE, 2013). No entanto, muitos dos tratamentos farmacológicos atualmente disponíveis têm efeitos adversos indesejáveis, como desconforto gástrico, reações de hipersensibilidade, erosão gástrica e aumento da suscetibilidade à infecção (MCDOUGALL, 2006; OLIVEIRA; SILVA; WENTZ *et al.*, 2014; ONG; LIRK; TAN *et al.*, 2007).

Na última década, vários estudos mostraram que compostos derivados de produtos naturais, como plantas superiores, são potencialmente interessantes para intervenções terapêuticas em várias doenças inflamatórias (BUDOVSKY; YARMOLINSKY; BEN-SHABAT, 2015; CALIXTO; KASSUYA; ANDRE *et al.*, 2005; MIDDLETON, 1998; QUINTANS; ANTONIOLLI; ALMEIDA *et al.*, 2014). Exemplos são os compostos fenólicos, como os flavonoides, que são conhecidos por terem atividade anti-inflamatória nas células de mamíferos (LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016; SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010). Além disso, sua ação anti-inflamatória está associada à sua capacidade antioxidante e capacidade de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e NO (HUGHES; KETHEESAN; HALEAGRAHARA, 2017; KIM; CHEON; KIM *et al.*, 1999; LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016; SERAFINI; PELUSO; RAGUZZINI, 2010). Assim, a modulação da atividade inflamatória, por meio do uso terapêutico de compostos naturais encontrados no Cerrado brasileiro, representa um grande potencial para o desenvolvimento de novas estratégias com o objetivo de prevenir e/ou controlar a progressão de doenças crônico-inflamatória.

1.5. Diabetes mellitus

O diabetes *mellitus* é um distúrbio metabólico caracterizado por hiperglicemia persistente resultante de uma secreção defeituosa de insulina (tipo 1) e/ou ineficiência da ação desse hormônio (tipo 2) (ROLO; PALMEIRA, 2006).

Segundo a Organização Mundial da Saúde, a patologia do diabetes *mellitus* tipo 2 afeta cerca de 422 milhões de pessoas em todo o mundo (ZHENG; LEY; HU, 2018). O atendimento dos pacientes com diabetes tipo 2 a nível mundial consome entre 5 e 10% do orçamento destinado ao sistema de saúde devido a uma maior frequência das consultas, internações e tratamentos mais complexos (RIOS; FRANCINI; SCHINELLA, 2015). Todos esses dados justificam a busca de terapias apropriadas e o desenvolvimento de medicamentos que possam tratar os indivíduos afetados.

O hormônio insulina é responsável pela promoção da absorção de glicose nos locais de armazenamento, por meio da interação com o seu receptor (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). Essa interação desencadeia uma via de sinalização *downstream* responsável por diversos efeitos metabólicos sobre os tecidos-alvo metabólicos, incluindo a manutenção da homeostase de glicose, lipogênese, aumento da síntese protéica e do crescimento e diferenciação celular (WILCOX, 2005). A resistência à insulina na maioria dos casos se manifesta a nível celular por meio de defeitos pós-receptor, o que pode tornar o efeito desse hormônio ineficiente (BERG; STRYER; TYMOCZKO, 2014). Os mecanismos possíveis incluem regulação negativa, deficiências ou polimorfismos genéticos da fosforilação da tirosina do receptor de insulina, de proteínas do receptor de insulina IRS ou da fosfatidilinositol 3-fosfato quinase, ou ainda anormalidades da função do receptor de glicose GLUT 4 (WILCOX, 2005). A patogênese da resistência à insulina envolve acúmulo de gordura ectópica, estresse do retículo endoplasmático e/ou inflamação sistêmica (SAMUEL; SHULMAN, 2012).

A hiperglicemia crônica é responsável pelo aumento da auto-oxidação da glicose, da fosforilação oxidativa e da formação de produtos finais de glicação avançada (AGEs, do inglês *advanced glycation end-products*), que podem induzir reações de estresse oxidativo e nitrosativo por meio da geração de ROS e espécies reativas de nitrogênio (RNS, do inglês *reactive nitrogen species*) (LI; TAN; WANG *et al.*, 2015). Além disso, a hiperglicemia, juntamente com a hiperlipidemia (níveis aumentados de ácidos graxos, triacilgliceróis e lipoproteínas modificadas), induz respostas imune-inflamatórias (PICKUP, 2004). Assim, o estresse oxidativo e processos inflamatórios induzidos pela hiperglicemia pode

causar danos aos tecidos, sendo o fígado o principal órgão afetado por ROS (SANCHEZ-VALLE; CHAVEZ-TAPIA; URIBE *et al.*, 2012).

As células hepáticas possuem os sistemas antioxidantes enzimático e não enzimático para reparar os danos resultantes do estresse oxidativo (DEY; LAKSHMANAN, 2013). As principais moléculas antioxidantes nas células são glutationa peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutationa redutase (GR), glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) e glutationa reduzida (GSH) (DEY; LAKSHMANAN, 2013; LI; TAN; WANG *et al.*, 2015; MEDINA; MORENO-OTERO, 2005). Estudos sugerem que, quando há aumentos nos níveis de ROS e RNS causados por um não controle da hiperglicemia, as espécies oxidativas e nitrosativas acabam superando o sistema de defesa antioxidant endógeno, levando a um desequilíbrio oxidante-antioxidante (MATSUNAMI; SATO; SATO *et al.*, 2009; PACHER; OBROSOVA; MABLEY *et al.*, 2005). A depleção de antioxidantes pelas complicações do diabetes tem sido bem documentadas (BAYNES; THORPE, 1999; GIACCO; BROWNLEE, 2010; JOHANSEN; HARRIS; RYCHLY *et al.*, 2005). Portanto, a razão para o uso terapêutico dos antioxidantes no tratamento e prevenção de complicações diabéticas é forte.

O uso de plantas medicinais era a principal forma de controle do diabetes antes do advento da insulina exógena (GRAY; FLATT, 1999). Os principais constituintes incluem os polifenóis, que podem atuar no aumento da liberação de insulina, na modificação do metabolismo de glicose e de lipídeos e/ou na inibição de fatores hiperglicemiantes (BAHADORAN; MIRMIRAN; AZIZI, 2013; PATEL; PRASAD; KUMAR *et al.*, 2012). Além disso, eles atuam como antioxidantes capazes de inibir várias enzimas produtoras de ROS, como xantina oxidase, ciclooxygenase, lipoxigenase, mono-oxigenase microssomal, glutationa-S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase (LU; LIN; YAO *et al.*, 2010). Estudos ainda mostram a atuação dos polifenóis na modulação da expressão gênica, aumentando a expressão de enzimas antioxidantes, tais como CAT, SOD e GPx, que estão envolvidas em diversos mecanismos intracelulares contra os processos oxidativos degenerativos, como alterações no DNA e peroxidação lipídica (KANG; FRANCIS; HILL *et al.*, 2019; LU; LIN; YAO *et al.*, 2010).

1.6. Estresse oxidativo e nitrosativo

O estresse oxidativo é o resultado da formação excessiva e/ou remoção insuficiente de moléculas altamente reativas, como ROS e RNS (BURTON; JAUNIAUX, 2011). Além disso, as AGEs podem ser formadas em condições hiperglicêmicas (AHMED, 2005). Assim, o estresse oxidativo, ROS e AGEs estão envolvidos na patogênese do diabetes *mellitus* e suas complicações (BAYNES; THORPE, 1999; BROWNLEE; CERAMI; VLASSARA, 1988).

As ROS incluem radicais livres como superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$), hidroxil ($\cdot\text{OH}$), peroxil ($\cdot\text{RO}_2$), hidroperoxil ($\cdot\text{HRO}_2^-$), assim como espécies não-radicais, como peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HOCl), enquanto que as RNS incluem radicais livres como óxido nítrico ($\cdot\text{NO}$) e dióxido de nitrogênio ($\cdot\text{NO}_2^-$), e não-radicais como peroxinitrito (ONOO^-), óxido nitroso (HNO_2) e peroxinitratos de alquila (RONOO) (FUBINI; HUBBARD, 2003). Dessa moléculas reativas, $\cdot\text{O}_2^-$, $\cdot\text{NO}$ e ONOO^- são as espécies mais amplamente estudadas e desempenham papéis importantes nas complicações diabéticas (JOHANSEN; HARRIS; RYCHLY *et al.*, 2005).

O radical superóxido ($\cdot\text{O}_2^-$) é produzido pela redução de um elétron do oxigênio por várias oxidases diferentes, incluindo NAD(P)H oxidase, xantina oxidase, ciclooxygenase e óxido nítrico sintase endotelial (eNOS, do inglês *endothelial nitric oxide synthase*) sob certas condições, assim como pela cadeia transportadora de elétrons mitocondrial durante o curso da fosforilação oxidativa (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003). Sob condições normais, o radical $\cdot\text{O}_2^-$ é rapidamente eliminado por mecanismos de defesa antioxidante, sendo desmutado em H_2O_2 pela Mn-SOD nas mitocôndrias e pelo Cu-SOD no citosol (TANIYAMA; GRIENDLING, 2003). O H_2O_2 é convertido em H_2O e O_2 pela GPx ou CAT nas mitocôndrias e lisossomos, respectivamente. O H_2O_2 também pode ser convertido no radical $\cdot\text{OH}$ altamente reativo na presença de elementos de transição como ferro e cobre (JOHANSEN; HARRIS; RYCHLY *et al.*, 2005) (Figura 6).

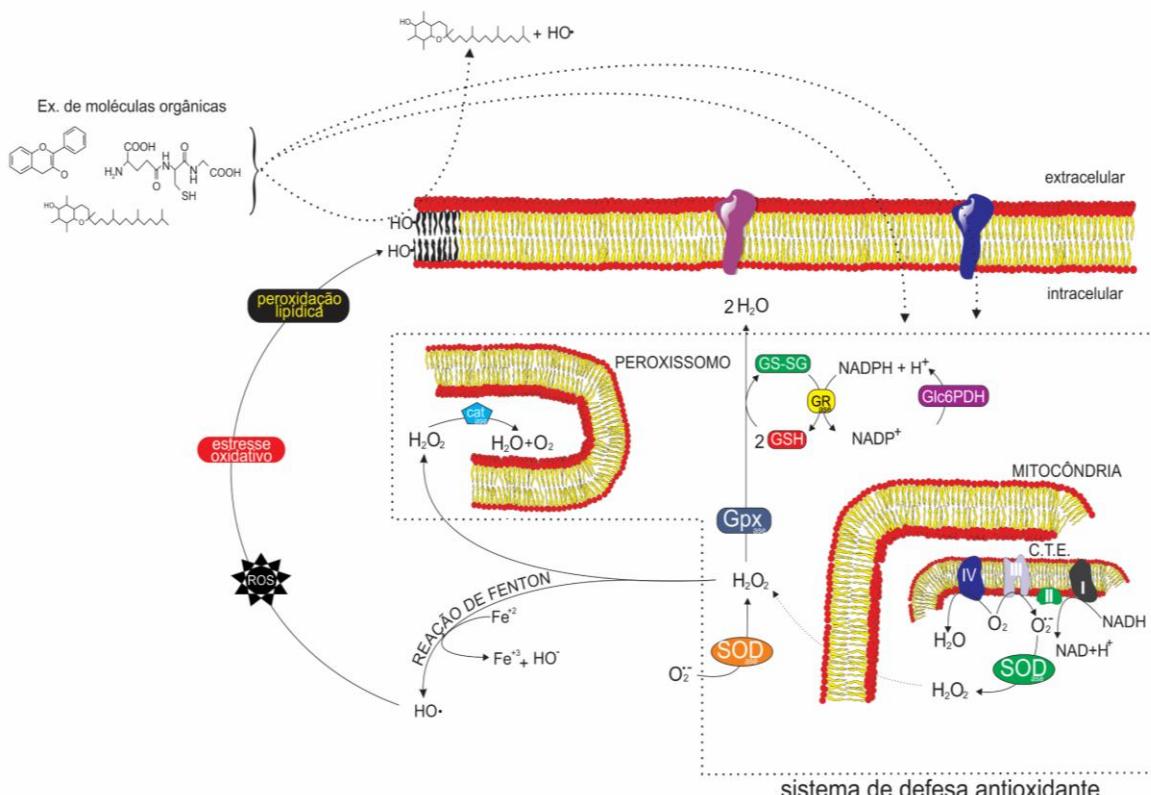


Figura 6: Desenho esquemático do sistema antioxidante endógeno destacando as principais moléculas antioxidantes que atuam sobre as espécies reativas de oxigênio. Nota: GS-SG: glutationa oxidada; GSH: glutationa reduzida; Glc6PDH: glicose 6-fosfato desidrogenase; GR: glutationa redutase; Gpx: glutationa peroxidase; SOD: superóxido dismutase; cat: catalase; ROS: espécies reativas de oxigênio; C.T.E.: cadeia transportadora de elétrons. Fonte: autor.

O radical $\cdot\text{NO}$ é normalmente produzido a partir de L-arginina pela eNOS na vasculatura, atuando como molécula vasculoprotetora (GELLER; BILLIAR, 1998). No entanto, $\cdot\text{NO}$ reage facilmente com o superóxido, gerando a molécula ONOO^- , que é altamente reativa (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). O peroxinitrito interage com lipídios, DNA e proteínas por meio de reações oxidativas diretas ou por mecanismos indiretos mediados por radicais, que desencadeiam uma cascata de eventos prejudiciais, comprometendo as células à necrose ou apoptose (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007). A presença e quantidade de $\cdot\text{O}_2^-$, determina se o $\cdot\text{NO}$ exerce efeitos protetores ou prejudiciais (JOHANSEN; HARRIS; RYCHLY *et al.*, 2005).

Em relação à geração de um desequilíbrio oxidante-antioxidante no fígado causado pela hiperglicemia, alguns estudos utilizando modelos diabetes induzido por estreptozotocina mostraram distúrbios metabólicos que afetam o potencial redox celular (DIAZ-FLORES; IBANEZ-HERNANDEZ; GALVAN *et al.*, 2006; MORAES; MANZAN-MARTINS; DE GOUVEIA *et al.*, 2015). As principais consequências do estresse induzido pelo diabetes são alterações nas enzimas antioxidantes, como GPx, SOD, CAT e GR, além do aumento da peroxidação lipídica, da carbonilação protéica e do conteúdo de óxido nítrico sintase indutível (iNOS), além de uma diminuição da atividade da G6PDH e dos níveis de GSH no fígado (CUMAOĞLU; CEVIK; RACKOVA *et al.*, 2007; DIAZ-FLORES; IBANEZ-HERNANDEZ; GALVAN *et al.*, 2006; MADAR; KALET-LITMAN; STARK, 2005; MORAES; MANZAN-MARTINS; DE GOUVEIA *et al.*, 2015). Devido à importância do estresse oxidativo no diabetes *mellitus* e suas complicações, a administração de antioxidantes foi postulada para evitar os danos causados por ROS e RNS (DEY; LAKSHMANAN, 2013). Assim, a descoberta de agentes antioxidantes mais eficazes, acessíveis e seguros a partir de produtos naturais torna-se uma abordagem atraente para o tratamento e controle do estresse oxidativo e nitrosativo associado ao diabetes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar as propriedades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória de frações ricas em polifenóis pré-purificadas do extrato etanólico da casca dos frutos de *Annona crassiflora* em modelos *in vivo* de estresse oxidativo e nitrosativo induzido por diabetes, e de dor inflamatória induzida por CFA.

2.2. Objetivos específicos

- Fracionar o extrato etanólico da casca do fruto de *Annona crassiflora* por meio de partição líquido-líquido, utilizando solventes de polaridade crescente para a obtenção das frações ricas em polifenóis;
- Dosar os níveis de NO, IL-6 e TNF- α em cultura de macrófagos estimulados com lipopolissacarídeo (LPS), na presença das frações orgânicas da casca do fruto de *Annona crassiflora*;
- Avaliar o efeito antinociceptivo da fração rica em polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora* (fração acetato de etila) na dor induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos;
- Investigar o efeito anti-inflamatório da fração rica em polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora* (fração acetato de etila) na inflamação induzida pela injeção intraplantar de adjuvante completo de Freund (CFA) em camundongos sobre os seguintes parâmetros: nocicepção mecânica, espontânea a ao frio; edema; infiltração de neutrófilos e análise histomorfológica;
- Avaliar a coordenação motora espontânea e forçada dos camundongos tratados com a fração rica em polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora* (fração acetato de etila);
- Dosar os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), fosfatase alcalina (ALP), γ -glutaryltransferase (γ -GT), triacilglicerois e colesterol em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com a fração rica em polifenóis da casca do fruto da *Annona crassiflora* (fração *n*-butanol);
- Investigar no fígado de ratos submetidos ao protocolo de diabetes induzido por estreptozotocia os efeitos do diabetes e do tratamento utilizando diferentes doses da fração *n*-butanol sobre os seguintes parâmetros: atividade das enzimas antioxidantes SOD, CAT, GPx e GR; níveis dos biomarcadores antioxidantes GSH, peroxidação lipídica e carbonilação de proteínas; alterações na expressão de biomarcadores proteicos do estresse oxidativo (SOD, CAT e GPx) e nitrosativo (iNOS e nitrotirosina); alterações histomorfológicas;

- Avaliar *in silico* o perfil de absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (ADMET) dos principais compostos das frações ricas em polifenóis da casca do fruto de *Annona crassiflora*.

3. Materiais e métodos

3.1. Reagentes

Reagentes e solventes de grau analítico foram adquiridos da Sigma (Sigma, St Louis, MO, EUA) ou de fornecedores locais. A água utilizada foi Milli-Q obtida por água desionizada filtrada em um filtro milipore.

3.2. Material vegetal

O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autorizou o acesso e a remessa de componente do patrimônio genético, nº 010743/2015-4. Os frutos de *A. crassiflora* foram coletados na região norte de Minas Gerais em março de 2017 (período de frutificação). A planta foi identificada por André Vito Scatigna do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, Brasil. Um espécime de comprovante (HUFU68467) foi depositado no Herbarium Uberlandense. As cascas do fruto de *A. crassiflora* foram separadas das polpas, e as cascas secas (secagem à temperatura ambiente po 24 h) e em pó (7,0 kg) foram extraídas pelo método de maceração por três dias com etanol a 98% (18 L) em temperatura ambiente (25 °C). Este processo foi realizado 6 vezes. Após a filtração, o etanol foi removido utilizando um evaporador rotativo (Buchi Rotavapor R-210, Suíça) em banho-maria a 40 °C sob pressão reduzida (344,7 g, 4,92%). O extrato bruto etanólico (100,0 g) foi ressuspendido em solução de metanol:água (9:1, v/v, 500 mL), filtrado (resíduo insolúvel 15,7 g) e submetido à extração líquido-líquido de acordo com um protocolo proposto por JUSTINO; MIRANDA; FRANCO *et al.* (2018) usando *n*-hexano (5 × 200 mL, 4,7 g), diclorometano (5 × 200 mL, 8,3 g), acetato de etila (5 × 200 mL, 4,7 g) e *n*-butanol (5 × 200 mL, 37,0 g). Além disso, uma fração aquosa

(15,2 g) foi obtida. Os solventes extractivos foram removidos usando um evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40 °C e as frações foram congeladas e liofilizadas (L101, Liobras, SP, Brasil) para remover a água restante.

3.3. Geração de macrófagos derivados da medula óssea (BMDM)

Este método foi baseado em LARMONIER; GHIRINGHELLI; LARMONIER *et al.* (2003). Os macrófagos foram obtidos por diferenciação de células da medula óssea de camundongos C57BL/6 machos com 6-8 semanas de idade. As células da medula óssea foram extraídas lavando a cavidade óssea com RPMI-1640 em um tubo de polipropileno estéril de 15 mL. As células foram homogeneizadas e a suspensão celular foi centrifugada (400 xg por 8 min, 4 °C). O sedimento foi homogeneizado em RPMI-1640 suplementado com 20% de soro fetal bovino (Gibco), 2 mM de L-glutamina, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e meio condicionado de 30% de células L929 (LCCM), que foi usado como fonte de fator estimulador de colônias de macrófagos (M-CSF, do inglês *macrophage colony stimulating factor*). As células foram mantidas a 37 °C e 5% de atmosfera de CO₂; 5,0 x 10⁶ células foram cultivadas para gerar os macrófagos derivados da medula óssea (BMDM, do inglês *bone marrow-derived macrophages*). BMDM foram coletados após 4 dias, removendo o sobrenadante das placas de cultura e removendo as células aderentes usando tampão fosfato-salino estéril gelado (PBS). Todos os procedimentos com animais foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética em Animais institucional (protocolo número 032/18).

3.4. Análise da produção de NO, IL-6 e TNF-α

BMDM foram transferidas para placas de 96 poços e tratadas com diferentes concentrações das frações *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da casca dos frutos de *A. crassiflora* (0,1; 0,3 e 1,0 µg/mL). Após 24 h, os macrófagos foram estimulados por lipopolissacarídeo (LPS) (100 ng/mL) e 6 h após a coleta do sobrenadante, foram analisados os níveis de mediadores inflamatórios (NO, IL-6 e TNF-α). O acúmulo de nitrito, um indicador da produção

de NO, foi determinada por um ensaio colorimétrico usando a reação de Griess (GRANGER; TAINTOR; BOOCKVAR *et al.*, 1996). IL-6 e TNF- α foram detectados usando o kit DuoSet para IL-6 e TNF- α específico de camundongo, de acordo com o protocolo do fabricante (Sistema de P&D). A fração que apresentou maior potencial inibitório contra NO, IL-6 e TNF- α foi utilizada nos ensaios *in vivo* de dor inflamatória.

3.5. Modelo de nocicepção e inflamação

3.5.1. Animais

Camundongos machos C57BL/6J/, pesando 20-25 g com seis semanas de idade, foram utilizados nos ensaios. Os animais foram alojados em um ambiente controlado (22 ± 2 °C) com um ciclo de 12 horas claro/escuro (luzes acesas entre 6:00 e 18:00) e alimentados *ad libitum*. Os animais foram aclimatados para a sala experimental por pelo menos 1 hora antes do experimento. Cada animal foi usado apenas uma vez. Todos os procedimentos e manuseio de animais foram cumpridos com as diretrizes da ARRIVE e aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU-105/17).

3.5.2. Nocicepção induzida por glutamato

Um modelo agudo de dor induzido por injeção intraplantar (ipl) de glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$) foi utilizado na pata traseira direita de camundongos; o volume final de injeções foi de 20 μL (CAVALCANTI, 2017). Para este ensaio, três grupos de animais foram pré-tratados por via oral (gavagem) com a fração acetato de etila da casca dos frutos de *A. crassiflora* (10, 30 e 100 mg/kg, diluída em água destilada) 30 min antes da injeção ipl de glutamato. O grupo controle recebeu injeção ipl de glutamato (10 $\mu\text{mol/pata}$) e tratamento oral com veículo. Imediatamente após as injeções, os animais foram colocados em câmaras de vidro planas (9 x 11 x 13 cm) e a resposta nociceptiva (tempo de lambar e

agitação das patas) foi cronometrada por 30 min e os resultados foram expressos como tempo de respostas nociceptivas em segundos (s).

3.5.3. Dor inflamatória induzida por CFA

Como modelo de dor inflamatória aguda e tardia, a injeção ipl de adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *complete Freund's adjuvant*) foi realizada de acordo com OLIVEIRA; SILVA; WENTZ *et al.* (2014). Os animais receberam injeção ipl de 20 µL de CFA (1 mg/mL) na pata traseira direita. Os parâmetros nociceptivos observados nas 1, 2, 4, 6 e 24 h após a injeção de CFA foram considerados respostas agudas, enquanto que a resposta tardia foi avaliada 48 h após a administração de CFA. Os animais foram tratados oralmente (gavagem) com a fração acetato de etila (30 mg/kg) e, 30 minutos depois, receberam a injeção de CFA; após 48 h, os mesmos animais foram tratados novamente com a fração e as medidas de dor foram realizadas 1, 2, 4, 6 e 24 h após esse segundo tratamento. O grupo controle recebeu a injeção ipl de CFA e foi tratado com veículo. O efeito antinociceptivo do tratamento testado foi avaliado por meio de vários parâmetros nociceptivos: alodinia mecânica estática, nocicepção espontânea e alodinia fria.

3.5.3.1. Nocicepção mecânica

Os animais foram ambientalizados em caixas de vidro transparentes individuais (9 x 7 x 11 cm) em plataformas de rede de arame elevadas para acessar a superfície ventral das patas traseiras. A sensibilidade mecânica foi então analisada com os filamentos de Von Frey de diferentes intensidades (0,008-6 g) aplicados na superfície das patas traseiras direitas dos animais. O limiar de retirada da pata foi determinado pelo método de subida e descida descrito por CHAPLAN; BACH; POGREL *et al.* (1994), com modificações. Quando o animal respondeu ao estímulo, foi aplicado o próximo filamento de menor intensidade e, quando o animal não respondeu ao estímulo, foi aplicado o próximo filamento de maior intensidade. O filamento de menor intensidade capaz de provocar uma resposta foi considerado o limiar nociceptivo mecânico (log mg). Os limiares de

retirada foram verificados em vários momentos após a injeção de CFA (fases aguda e tardia, como citado acima) e foram comparados com os valores basais (antes da injeção de CFA).

3.5.3.2. Nocicepção espontânea

Para avaliar a nocicepção espontânea, antes das medidas de sensibilidade mecânica, o comportamento de apoiar a pata injetada pelos animais foi classificado conforme uma escala que varia de 0 a 3, conforme CODERRE e WALL (1987), com modificações. Nesta escala, 0 é considerado para o peso corporal normalmente distribuído nas quatro patas; 1 para o peso corporal ligeiramente depositado na ponta da pata injetada; 2 para o peso corporal depositado na pata injetada e 3 para a pata injetada totalmente retraída.

3.5.3.3. Nocicepção a frio

A sensibilidade ao frio dos animais foi avaliada por um estímulo com acetona (20 µl), de acordo com CASPANI; ZURBORG; LABUZ *et al.* (2009), com modificações. Para este ensaio, foram observadas e cronometradas as respostas de lamber e sacudir as patas do animal após o resfriamento causado pela evaporação da acetona aplicada topicalmente na pata traseira direita. Os resultados foram expressos como tempo de respostas nociceptivas em segundos (s).

3.5.3.4. Edema da pata

O edema da pata induzido pela injeção de CFA foi considerado como o aumento da espessura da pata, medido com um paquímetro digital (SILVA; OLIVEIRA; HOFFMEISTER *et al.*, 2016). A espessura da pata foi verificada em vários momentos após a injeção de CFA, nas fases aguda e tardia, e comparada aos valores basais. Os resultados foram expressos como espessura da pata (mm). A posição do paquímetro foi realizada no centro da pata traseira em todas as medidas.

3.5.3.5. Infiltração de neutrófilos

Para avaliar a infiltração de neutrófilos no tecido da pata, foram coletadas amostras de pele da pata 4 h após a injeção ipl de veículo ou CFA (4,5 h após o tratamento com 30 mg/kg da fração acetato de etila) e a atividade de mieloperoxidase (MPO) foi avaliada. Primeiramente, as amostras foram obtidas e homogeneizadas com um homogeneizador motorizado em tampão acetato de sódio contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamónio e centrifugadas. O sobrenadante foi então incubado com tampão acetato e 3,3'5,5 'tetrametilbenzidina durante 3 min a 37 °C e a reação foi avaliada por um espectrofotômetro a 630 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA). Os valores foram expressos em densidades ópticas, corrigidas pelo teor de proteínas, medido de acordo com BRADFORD (1976).

3.5.3.6. Análises histológicas

As amostras de pata foram coletadas 4 h após injeções de CFA (4,5 h após o tratamento com 30 mg/kg da fração acetato de etila) e fixadas em formaldeído a 10% em solução tampão fosfato 0,1 M por 24 h. As patas foram desmineralizadas em solução de EDTA a 4,13%, pH 7,4, por 4 semanas e depois embebidas em parafina. De cada pata, foram obtidos 6 cortes histológicos semi-seriados (5 µm) e corados com hematoxilina-eosina (HE) (n = 4 animais/grupo). Todas as seções histológicas foram escaneadas com o scanner Aperio AT Turbo (Copyright 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc. Nußloch, Baden-Württemberg/Alemanha) com uma ampliação de 20 ×. Três campos aleatórios foram observados em cada lâmina corada com HE para quantificar a presença de células inflamatórias (leucócitos polimorfonucleares) na camada da derme no tecido da pata usando o software NIH Image J 13.6 (NIH, Bethesda, MD, EUA). Os resultados foram expressos como o número de células polimorfonucleares por campo.

3.5.4. Testes de campo aberto e rotarod

Os testes de campo aberto e rotarod também foram realizados para excluir possíveis efeitos sedativos e de relaxamento muscular inespecíficos da fração acetato de etila sobre a atividade locomotora espontânea ou forçada, respectivamente (DE PRA; FERRO; MILIOLI *et al.*, 2017). Os camundongos foram testados em um aparelho equipado com uma barra rotativa (velocidade = 5 voltas/min; diâmetro = 1 cm; comprimento = 5 cm). Todos os animais foram submetidos a uma seção de treinamento, onde foram excluídos os animais com três ou mais quedas durante uma seção de 120 s. 24 h depois, os animais foram tratados com 30 mg/kg de fração, veículo ou 10 mg/kg de diazepam 120 min antes do teste do rotarod ($n = 6$ /grupo). O número de quedas e a latência até a primeira queda do aparelho foram registrados por uma duração de 240 s. No teste de campo aberto, o aparato consistia em uma caixa medindo $28 \times 18 \times 12$ cm com um piso dividido em 15 áreas idênticas. Os animais foram tratados com 30 mg/kg de fração ou veículo. Após 120 min, os animais foram transferidos para o aparelho e observados por 5 min. O número de áreas cruzadas com todas as patas (cruzamentos) e o número de levantamentos foram registrados.

3.6. Modelo de estresse oxidativo e nitrosativo

3.6.1. Animais

Ratos Wistar machos (cerca de 7 semanas de idade e pesando 200-270 g) foram mantidos em condições padrão (22 ± 1 °C, umidade $60 \pm 5\%$ e 12 horas claras/12 horas escuras) e receberam comida e água *ad libitum*. Todas os experimentos com os animais estavam em conformidade com as diretrizes da ARRIVE e foram realizadas de acordo com NIH Publications No. 8023 (revisada em 1978). Foram adotados os procedimentos de manuseio e uso dos ratos, propostos pela Sociedade Brasileira de Ciência Animal de Laboratório e pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Uberlândia, Brasil (CEUA/UFU 090/15).

3.6.2. Indução do diabetes por estreptozotocina

Os ratos foram submetidos a jejum por 24 horas e receberam uma injeção intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, 45 mg/kg, dissolvida em tampão citrato de sódio 0,01 M, pH 4,5) para induzir o diabetes. Os ratos do grupo controle receberam o mesmo volume de tampão citrato. A glicose no sangue foi determinada pela retirada de sangue, com uma lanceta, da cauda e medida com tiras de teste (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, Basileia Suíça) 7 dias após a injeção de STZ. Os ratos com glicemia de jejum > 250 mg/dL foram classificados como diabéticos.

3.6.3. Grupos e tratamento

Os animais foram divididos em 6 grupos de 6 animais: grupo controle não diabético (ND), diabéticos não tratados (D), diabéticos tratados com 2 unidades diária de insulina (DI), diabéticos tratados com a fração *n*-butanol do extrato etanólico da casca do fruto de *Annona crassiflora*, nas doses de 25 mg/kg (D25), 50 mg/kg (D50) e 100 mg/kg (D100). A fração *n*-butanol foi escolhida por ter apresentando maior atividade antioxidante *in vitro* do que as demais frações orgânicas da casca do fruto de *A. crassiflora* em um estudo prévio (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). A fração foi diluída em água filtrada e administrada uma vez por dia no período da tarde por gavagem, durante 30 dias. O peso corporal e os níveis glicêmicos foram monitorados. Ao final do experimento, os animais foram mantidos em jejum de 12 horas e, após anestesia com xilazina/quetamina (1:1), foram sacrificados.

3.6.4. Parâmetros bioquímicos séricos

No final do tratamento, o sangue foi coletado e centrifugado a 1500 xg por 10 min para obtenção do soro para análise bioquímica: triglicerídeos, colesterol, fosfatase alcalina (ALP), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e γ - glutariltransferase (γ -GT). Todos esses parâmetros foram medidos no Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade Federal de Uberlândia, com analisador automático (Cobas Mira; Roche Diagnostic Systems, Basileia, Suíça), utilizando kits

comerciais (Labtest Diagnóstica; Lagoa Santa, Brasil). Os níveis de glicose foram medidos por punção das veias da cauda usando tiras reativas (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostic Systems, Basileia, Suíça).

3.6.5. Coleta das amostras e preparação dos tecidos

O fígado foi rapidamente removido e lavado em solução salina normal (NaCl a 0,9%). Parte do tecido foi congelada em nitrogênio líquido e armazenado a -80 °C para análises bioquímicas e a outra parte foi fixada em formaldeído 10% e incluída em parafina para fins morfológicos. Para a análise dos marcadores de estresse oxidativo e Western Blotting, o tecido foi homogeneizado em tampão fosfato de sódio (20 mM) contendo KCl a 140 mM (1:10 m/v, pH 7,4). Os homogeneizados foram centrifugados a 800 xg por 10 min a 4 °C, e a concentração total de proteínas no sobrenadante das amostras foi determinada seguindo o ensaio de Bradford (BRADFORD, 1976).

3.6.6. Níveis dos biomarcadores antioxidantes no fígado

3.6.6.1. Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total hepática foi avaliada pelo método do poder antioxidante redutor férrico (FRAP, do inglês *ferric reducing antioxidant power*) (BENZIE; STRAIN, 1996). Os antioxidantes presentes nas amostras reduzem Fe³⁺ a Fe²⁺, que é quelado por 2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina (TPTZ), formando o complexo Fe²⁺-TPTZ. Os homogeneizados hepáticos foram incubados com o reagente FRAP (10 volumes de tampão acetato de sódio 0,3 M, pH 3,6, 1 volume de TPTZ a 10 mM e 1 volume de cloreto férrico a 20 mM) a 37 °C por 6 min. A absorbância foi medida a 593 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA); um valor de absorbância do branco (de poços sem homogeneizado de fígado) foi subtraído de todos os valores de absorbância. A atividade antioxidante foi determinada usando uma curva analítica, construída com trolox como padrão.

3.6.6.2. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com as substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS, do inglês *thiobarbituric acid reactive substances*) pela reação entre o malondialdeído presente nas amostras de fígado (MDA) e o ácido tiobarbitúrico (0,67% de TBA) (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016). A fluorescência da fase orgânica foi medida a 515 nm_{ex} e 553 nm_{em} (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA); um valor de fluorescência do branco (de poços sem homogeneizado de fígado) foi subtraído de todos os valores de fluorescência. A peroxidação lipídica foi determinada usando uma curva analítica construída com MDA.

3.6.6.3. Carbonilação proteica

A carbonilação das proteínas foi avaliada por meio de derivatização do grupo carbonila com 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), com a formação do produto estável 2,4-dinitrofenil (DNP), cuja detecção foi feita a 370 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA). A carbonilação das proteínas foi determinada de acordo com o espectro de diferença entre a amostra tratada com DNPH em HCl e a amostra tratada apenas com HCl (LEVINE; GARLAND; OLIVER *et al.*, 1990).

3.6.6.4. Nível de glutationa reduzida (GSH)

As proteínas do homogeneizado de fígado foram precipitadas com ácido metafosfórico e as amostras foram centrifugadas a 7000 xg por 10 min. O sobrenadante foi incubado com 100 mM de tampão fosfato de sódio, pH 8,0, 5 mM de EDTA e 1 mg/mL de orto-ftalialdeído diluído em metanol. A fluorescência foi medida a 350 nm_{ex} e 420 nm_{em} (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA); um valor de fluorescência do branco (de poços sem homogeneizado de fígado) foi subtraído de todos os valores de fluorescência. Uma curva analítica construída com GSH como padrão foi usada para determinar o conteúdo de GSH (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

3.6.7. Atividade das enzimas antioxidantes

3.6.7.1. Atividade da superóxido dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pela inibição da auto-oxidação do pirogalol pela SOD presente nas amostras. Os homogeneizados de fígado foram incubados com 50 mM de tampão Tris-HCl (pH 8,2) contendo 1 mM de EDTA, 80 U/mL de catalase e 24 mM de pirogalol, e o ensaio cinético foi monitorado durante 10 min a 420 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) usando uma curva analítica construída com SOD como padrão (MARKLUND; MARKLUND, 1974).

3.6.7.2. Atividade da catalase (CAT)

A avaliação da atividade da CAT foi baseada na decomposição do peróxido de hidrogênio pela CAT presente nas amostras. Os homogeneizados de fígado foram incubados com 10% de Triton X-100 e misturados com 10 mM de tampão fosfato de potássio, pH 7,0, contendo 0,2% de peróxido de hidrogênio. A decomposição do peróxido de hidrogênio foi monitorada a 240 nm durante 10 min (Perkin-Elmer LS 55, Massachusetts, EUA) (AEBI, 1984).

3.6.7.3. Atividade da glutationa peroxidase (GPx)

A atividade da GPx foi medida de acordo com a redução de nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) pela glutationa redutase que reduziu uma ponte dissulfeto de glutationa criada pela GPx presente nas amostras. Os homogeneizados de fígado foram incubados com tampão fosfato de potássio a 100 mM, pH 7,7, 1 mM de EDTA, 40 mM de azida de sódio, 100 mM de glutationa reduzida (GSH) diluída em ácido metafosfórico a 5%, 4,5 U de glutationa redutase (GR), 2 mM NADPH diluído em bicarbonato de sódio a 5% e 0,5 mM de terc-butil. A decomposição do NADPH foi avaliada por 10 min a 340 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

3.6.7.4. Atividade da glutationa redutase (GR)

A atividade da GR foi avaliada de acordo com o consumo de NADPH usando glutationa oxidada como substrato. Os homogeneizados de fígado foram incubados com 200 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5, 6,3 mM de EDTA, 10 mM de glutationa oxidada e 3 mM de NADPH. O decaimento da concentração de NADPH foi avaliado por 10 min a 340 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

3.6.7.5. Atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (G6PDH)

A atividade da G6PDH foi monitorada pela produção de NADPH com um consequente aumento na absorbância a 340 nm. Os homogeneizados de fígado foram incubados com 100 mM de tampão Tris-HCl, pH 7,5, 2 mM de MgCl₂, 0,5 mM de NADP⁺ e 1 mM de glicose-6-fosfato, e a cinética do ensaio foi monitorada por 10 min (Molecular Devices, Menlo Park, CA, EUA) (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016).

3.6.8. Expressão dos biomarcadores proteicos do estresse oxidativo

A análise da expressão dos biomarcadores proteicos do estresse oxidativo foi realizada por Western Blotting. Alíquotas do sobrenadante das amostras foram solubilizados em tampão de amostra de eletroforese contendo 100 mM de Tris-HCl pH 8,0 e 25% de glicerol. 20 µg de proteína foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil-sulfato de sódio (SDS-PAGE, 5-22%) e, em seguida, foram eletrotransferidos para membranas de nitrocelulose (Hybond® ECL™) em tampão Tris-glicina (TOWBIN; STAHELIN; GORDON, 1992) durante 2 h a 100 mA. As membranas foram bloqueadas com 5% de leite desnatado em PBS-Tween (0,05% de Tween 20) por 4 h e, em seguida, foram incubadas com anticorpos primários de CAT, SOD, GPx, óxido nítrico sintase induzível (iNOS) e nitrotirosina (N-Tir) (0,1 µg/mL) *overnight*. As amostras foram incubadas com um anticorpo secundário conjugado com peroxidase por 4 h. Os anticorpos ligados às membranas foram visualizados por quimioluminescência (Amersham ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, Reino Unido). A intensidade das bandas de

proteínas foi analisada pelo software ImageQuantTL e os resultados foram expressos em densitometria.

3.6.9. Análises histológicas

A histologia foi determinada pela fixação dos fígados em formalina tamponada com fosfato a 10%, incorporação em parafina e depois coloração com hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas foram analisadas e capturadas em um microscópio OLYMPUS (Tóquio, Japão), equipado com uma câmera OPTICAM OPT 10 MP.

3.7. Predição das propriedades farmacocinéticas *in silico*

As propriedades farmacocinéticas foram previstas pelo pKCSM, uma plataforma integrada que usa assinaturas baseadas em gráficos, que são representações matemáticas de entidades químicas, das quais diferentes descritores que abrangem estrutura molecular e química podem ser extraídos (PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B., 2015). Essas assinaturas foram usadas para avaliar a absorção intestinal, volume de distribuição no estado estacionário (Vdss), fração não ligada, inibição do citocromo p, toxicidade aguda por via oral (LD50), toxicidade crônica por via oral (LOAEL) e hepatotoxicidade da procianidina B2, epicatequina, catequina, ácido clorogênico e cafeoilglicosídeo, que foram identificados na fração *n*-butanol por análise por CLAE-ESI-MS/MS (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016).

3.8. Análises estatísticas

As análises estatísticas e gráficos foram feitos no software GraphPad Prism 6.0. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. A significância da diferença foi calculada usando ANOVA unidirecional e bidirecional e pós-testes de Dunnett e Tukey para múltiplas comparações. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. A

normalidade na distribuição dos dados foi avaliada por meio do teste Kolmogorov-Smirnov.

4. Resultados

4.1. Rendimento da extração

A extração etanólica da casca dos frutos de *A. crassiflora* teve um rendimento total de cerca de 5%. Entre as frações orgânicas do extrato etanólico, as frações *n*-hexano, diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa apresentaram os rendimentos 5,5; 9,8; 5,5; 43,8 e 18,0%, respectivamente (em relação ao extrato bruto etanólico).

4.2. Efeito das frações nos níveis de NO, IL-6 e TNF- α

Como o estímulo inflamatório induz a liberação de diferentes mediadores inflamatórios como citocinas e NO (JIANG; HE; YANG *et al.*, 2014), as frações do extrato bruto etanólico da casca dos frutos de *A. crassiflora* foram primeiramente testadas sobre a produção de NO, IL-6 e TNF- α (Figura 7). O LPS estimulou a produção de NO, IL-6 e TNF- α nos macrófagos diferenciados ($p < 0,001$). Os tratamentos com as frações acetato de etila, nas concentrações de 0,1 e 0,3 $\mu\text{g/mL}$, e *n*-butanol a 1 $\mu\text{g/mL}$, reduziram a produção de NO (Figura 7b) e IL-6 (Figura 7d) nos macrófagos estimulados por LPS ($p < 0,001$). As frações *n*-hexano e diclorometano não foram capazes de reduzir os níveis de NO e IL-6. Com relação ao TNF- α , não foi observada redução em sua produção após os tratamentos nos macrófagos estimulados por LPS (Figura 7f).

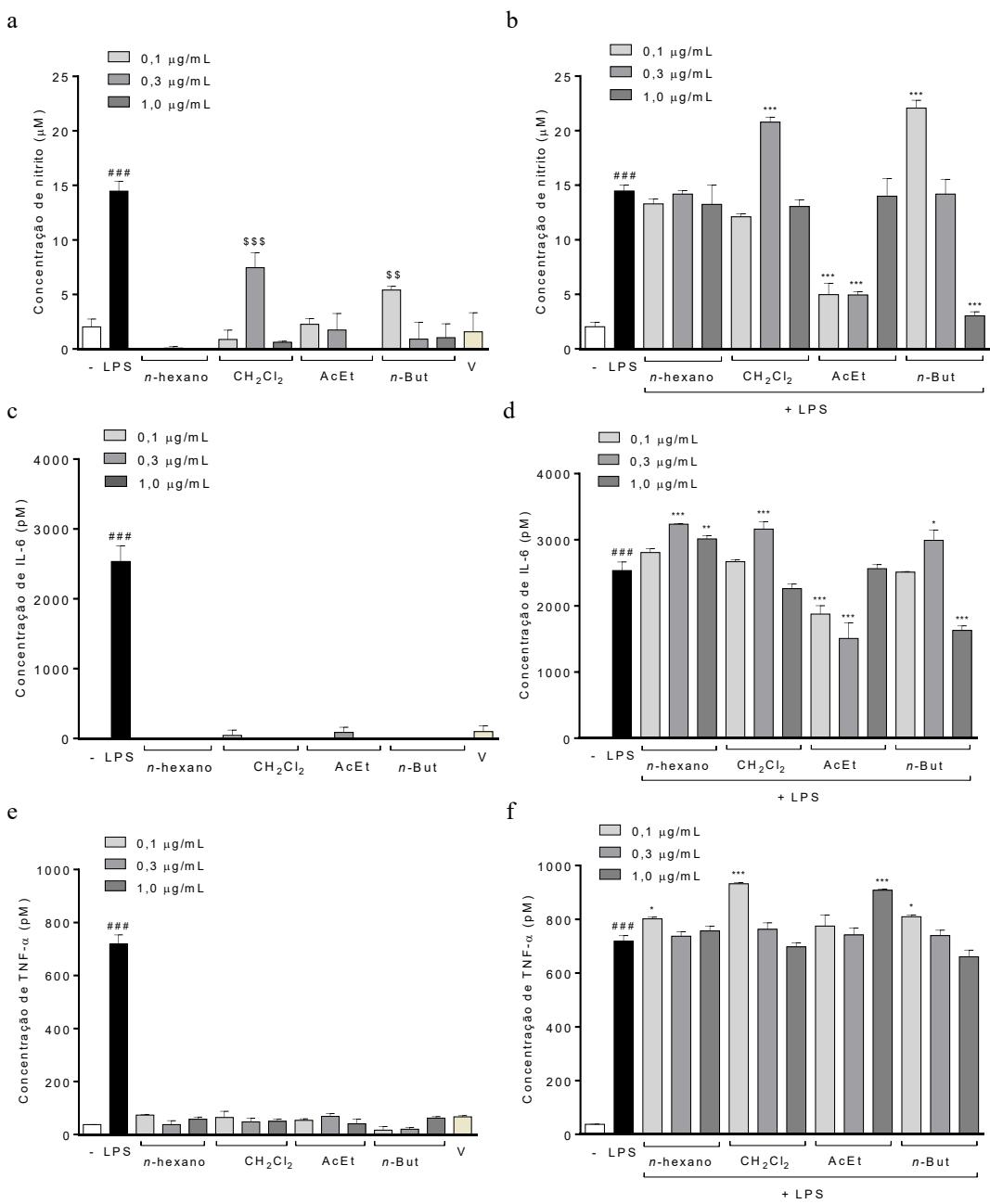


Figura 7. Efeito das frações orgânicas da casca dos frutos de *Annona crassiflora* sobre a produção de NO (a), IL-6 (c) e TNF- α (e) por macrófagos diferenciados e macrófagos diferenciados estimulados por LPS (b, d e f). As colunas representam a média + erro padrão da média. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ quando comparado às células não tratadas (LPS) estimuladas por LPS; # $p < 0,05$, ## $p < 0,01$, ### $p < 0,001$, \$\$ $p < 0,01$ e \$\$\$ $p < 0,001$ versus controle (ANOVA unidirecional e Dunnett como pós-teste). Nota: -: controle

sem LPS e fração, *n*-hexano: fração *n*-hexano, CH₂Cl₂: fração diclorometano, AcEt: fração acetato de etila, *n*-But: fração *n*-butanol, V: veículo.

Interessantemente, os macrófagos induzidos por LPS e posteriormente tratados com a fração diclorometano mostraram aumentos nos níveis de NO e IL-6 a 0,3 µg/mL, e de TNF- α a 0,1 µg/mL. A fração *n*-hexano também estimulou a produção de IL-6 (0,3 e 1 µg/mL) e TNF- α (0,1 µg/mL) nos macrófagos induzidos por LPS. Em relação aos macrófagos sem indução de LPS, as frações diclorometano (a 0,3 µg/mL) e *n*-butanol (a 0,1 µg/mL) estimularam a produção de NO (Figura 7a). Como a fração acetato de etila não estimulou as produções de NO, IL-6 e TNF- α e foi capaz de reduzir a produção de NO e IL-6 nos macrófagos estimulados por LPS, essa fração foi utilizada para os ensaios *in vivo*.

4.3. Propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória da fração acetato de etila da casca dos frutos de *A. crassiflora*

4.3.1. Efeito da fração acetato de etila na nocicepção induzida por glutamato

Para investigar os possíveis efeitos antinociceptivos *in vivo* da fração rica em polifenóis da casca dos frutos de *A. crassiflora* (acetato de etila), foi testada a nocicepção aguda induzida pela injeção intraplantar de glutamato, uma vez que os receptores de glutamato e NO estão envolvidos na indução da nocicepção (LEONG; LIU; YEO, 2000; MELLER; DYKSTRA; GEBHART, 1996; ZIMMERMANN, 1983). Uma curva dose-resposta foi construída com a fração acetato de etila administrada por via oral. Como mostrado na Figura 8, o glutamato a 10 µmol/20 µL por pata induziu um comportamento de lambida que caracteriza o desenvolvimento da nocicepção, que foi reduzida pela administração oral da fração acetato de etila nas doses de 30 e 100 mg/kg ($p < 0,05$), com inibições de 75 ± 7 e 44 ± 9%, respectivamente. A dose de 30 mg/kg foi selecionada para realizar os próximos ensaios.

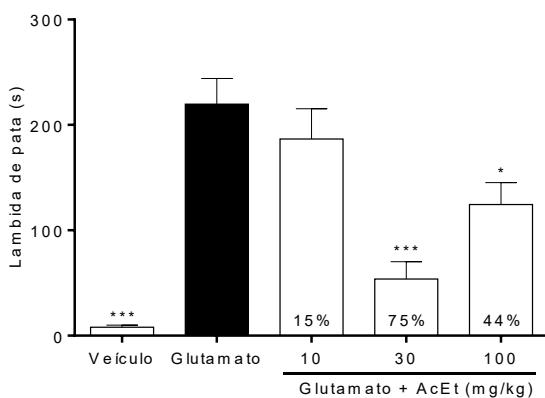


Figura 8: Efeito do tratamento oral com a fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (10 - 100 mg/kg) ou veículo (10 mL/kg) no comportamento da dor induzida pela administração intraplantar de glutamato em camundongos ($n = 6$). As colunas representam a média + erro padrão da média, com valores percentuais de redução de lambida de pata. ANOVA unidirecional seguida pelo pós-teste de Dunnett, $*p < 0,05$, $^{***}p < 0,001$ em comparação com o grupo glutamato. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

4.3.2. Efeito da fração acetato de etila na dor inflamatória

Para avaliar o possível efeito antinociceptivo da fração acetato de etila na dor aguda e tardia, foi utilizando o modelo de CFA em camundongos. Foi observado o desenvolvimento de uma hiperalgesia mecânica aguda e tardia, quando comparada à medida basal, caracterizada por uma redução significativa no limiar de retirada da pata quando os filamentos de von Frey foram aplicados na pata injetada ($p < 0,01$) (Figura 9). O pré-tratamento dos camundongos com a fração acetato de etila (30 mg/kg) apresentou uma redução na hiperalgesia aguda induzida por CFA (2,0 - 4,0 h após sua administração, $p < 0,01$) (Figura 9a). Além disso, a fração (30 mg/kg) foi capaz de reverter a hiperalgesia tardia induzida por CFA (1,0 - 6,0 h após a sua administração, $p < 0,05$) (Figura 9b). Também foi observado que a fração acetato de etila reduziu as respostas nociceptivas ao frio no tempo de 4 h (fases aguda e tardia, $p < 0,05$), indicadas pela diminuição do lamber e sacudir de pata quando a pata injetada foi exposta à acetona (Figura 10). No entanto, a resposta à dor espontânea foi semelhante entre os grupos nas fases aguda e tardia (Figuras 11a e 11b, respectivamente).

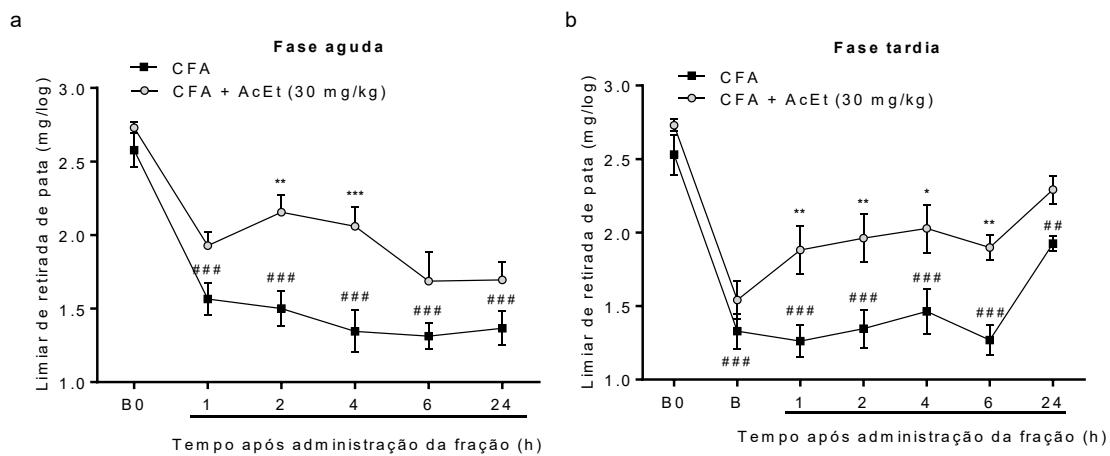


Figura 9: Avaliação do tempo-resposta da fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (30 mg/kg) sobre a hipersensibilidade mecânica na fase aguda (a) e tardia (b) em camundongos ($n = 8$). A fração foi administrada 0,5 h antes da injeção de CFA e 48 h após a injeção de CFA. B0 indica o limiar basal antes da injeção intraplantar de CFA e da administração oral da fração, e B indica o limiar 48 h após a injeção intraplantar de CFA e antes da segunda administração oral da fração. Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA bidirecional seguida pelo teste post hoc de Bonferroni, $##p < 0,01$, $###p < 0,001$ quando comparado com o limiar basal (B0); $*p < 0,05$, $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$ em comparação com o grupo que recebeu apenas a injeção intraplantar de CFA. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

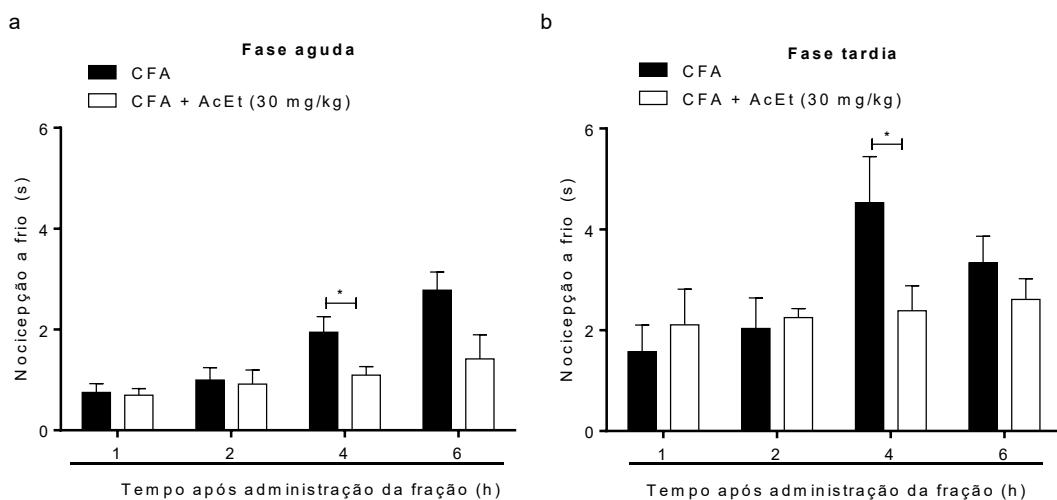


Figura 10: Avaliação do tempo-resposta da fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (30 mg/kg) sobre a hiperalgesia a frio na fase aguda

(a) e tardia (b) em camundongos ($n = 8$). A fração foi administrada 0,5 h antes da injeção de CFA e 48 h após a injeção de CFA. Resultados expressos como média + erro padrão da média. ANOVA bidirecional seguida pelo teste post hoc de Bonferroni, $*p < 0,05$ em comparação com o grupo que recebeu apenas a injeção intraplantar de CFA. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

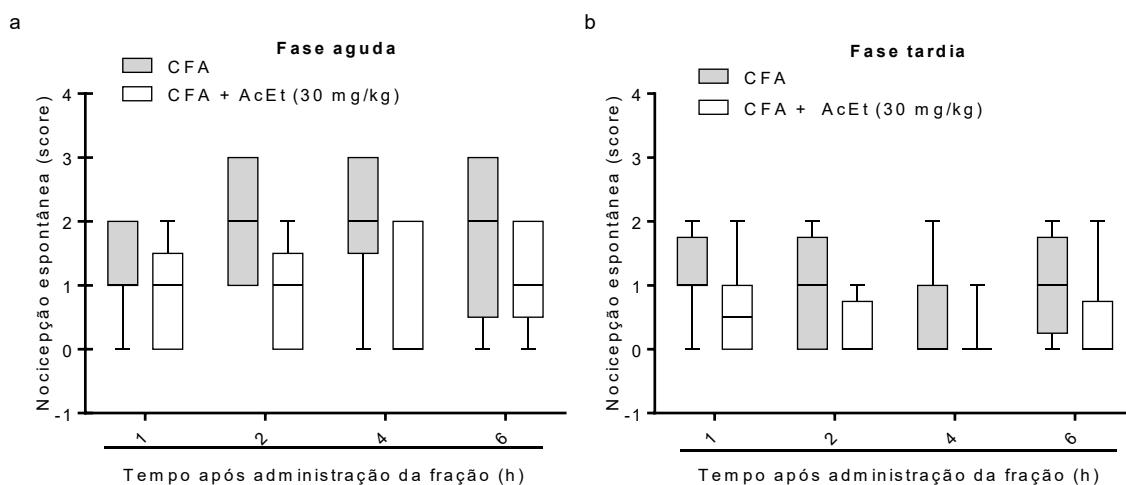


Figura 11: Avaliação do tempo-resposta da fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (30 mg/kg) sobre a nocicepção espontânea na fase aguda (a) e tardia (b) em camundongos ($n = 8$). A fração foi administrada 0,5 h antes da injeção de CFA e 48 h após a injeção de CFA. Resultados expressos como mediana ± intervalo interquartil. ANOVA bidirecional seguida pelo teste post hoc de Bonferroni. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

4.3.3. Efeito da fração acetato de etila na inflamação induzida por CFA

Os camundongos que receberam CFA apresentaram edema caracterizado pelo aumento da espessura da pata, quando comparado com a medida basal, principalmente às 24 e 48 h após a injeção de CFA (de $3,9 \pm 0,1$ para $4,5 \pm 0,2$ mm, $p < 0,05$) (Figuras 12a e 12b). O pré-tratamento com a fração acetato de etila impediu a formação de edema causado por CFA às 2, 4 e 24 h após a administração na fase aguda ($p < 0,05$) (Figura 12a). A fração não foi capaz de reduzir o edema na fase tardia (Figura 12b).

Para verificar se a reversão da hiperalgesia e edema promovida pela fração acetato de etila (30 mg/kg) também foi associada a uma redução na infiltração de leucócitos, 4 h após a injeção de CFA, a infiltração de leucócitos foi avaliada pela medida da atividade da mieloperoxidase (MPO, marcador de neutrófilos) nos tecidos da pata traseira. O CFA aumentou a atividade da MPO quando comparada ao grupo veículo ($p < 0,001$) (Figura 12c). O tratamento diminuiu esse parâmetro inflamatório com uma inibição de $40 \pm 12\%$ (Figura 12c).

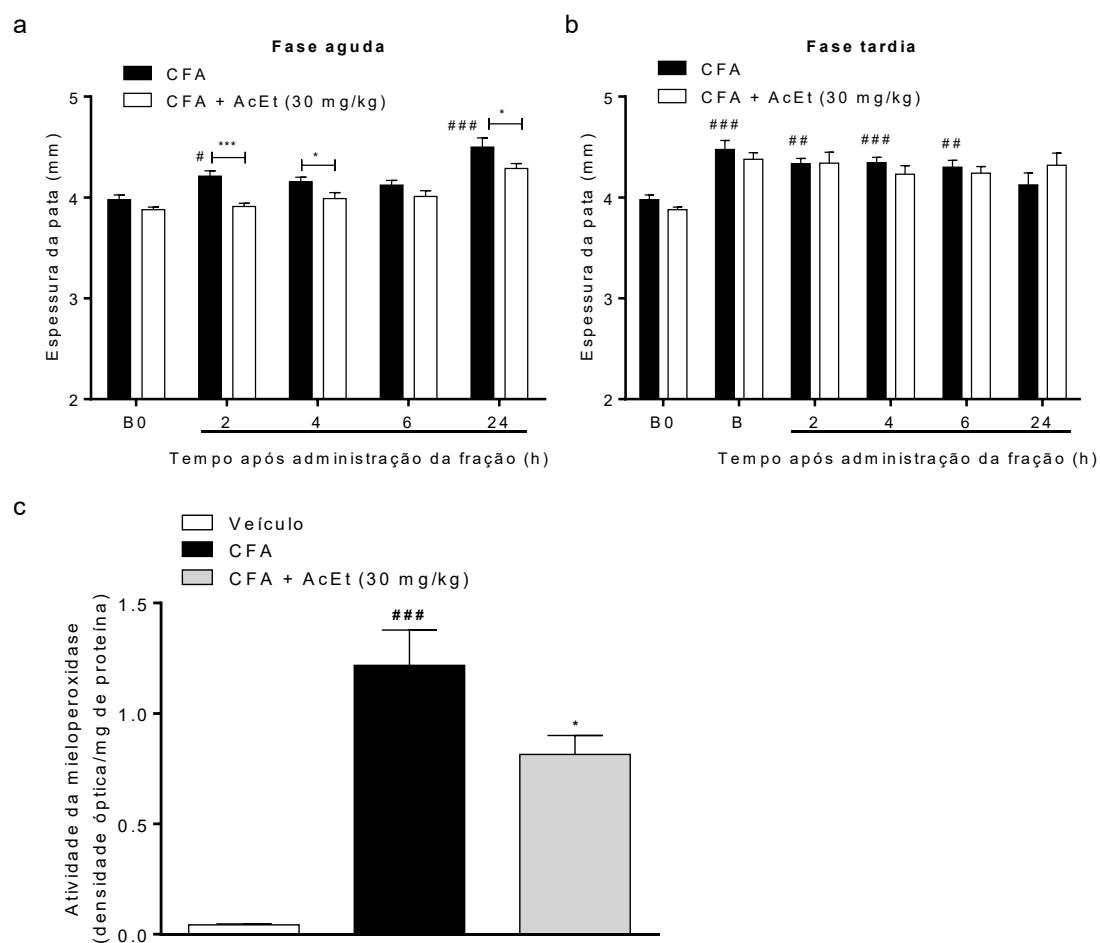


Figura 12: Avaliação do tempo-resposta da fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (30 mg/kg) no edema de pata induzido por injeção intraplantar de CFA em camundongos ($n = 8$) nas fases aguda (a) e tardia (b). A fração foi administrada 0,5 h antes da injeção de CFA e 48 h após a injeção de CFA. B0 indica o limiar basal antes da injeção intraplantar de CFA e da administração oral da fração, e B indica o limiar 48 h após a injeção intraplantar de CFA e antes da segunda administração oral da fração. (c) mostra a atividade

da mieloperoxidase do tecido da pata de camundongos 4 h após a injeção intraplantar de veículo ou CFA e 4,5 h após o tratamento com a fração acetato de etila ($n = 4$). As colunas representam a média + erro padrão da média. ANOVA bidirecional seguida pelo teste post hoc de Bonferroni e ANOVA unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, $\#p < 0,05$, $\#\#p < 0,01$, $\#\#\#p < 0,001$ quando comparado com o limiar basal (B0) ou grupo veículo; $*p < 0,05$ e $^{***}p < 0,001$ em comparação com o grupo que recebeu apenas a injeção intraplantar de CFA. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

Além disso, a análise histológica foi feita para confirmar a infiltração de leucócitos no tecido da pata, 4 h após a injeção de CFA. Foi observado que o CFA aumentou a infiltração de leucócitos no tecido cutâneo da pata quando comparado ao grupo veículo (controle) (Figura 13). O número de células inflamatórias infiltradas foi menor no grupo tratado com a fração acetato de etila (30 mg/kg) quando comparado ao grupo que recebeu apenas CFA, com inibição de $40 \pm 9\%$ ($p < 0,001$) (Figura 13).

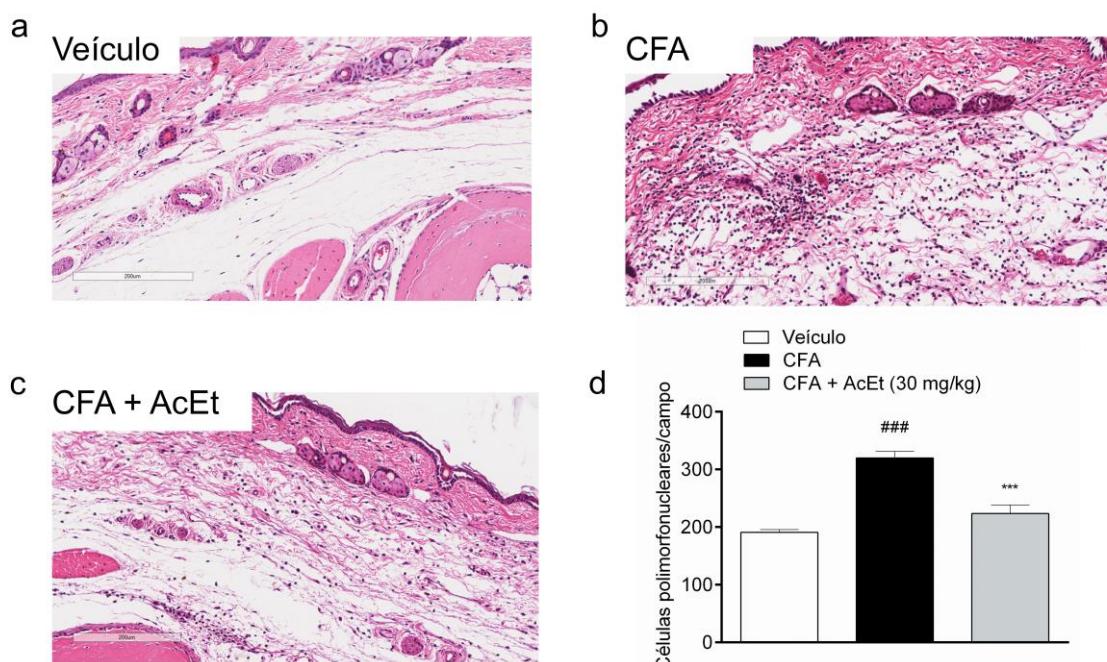


Figura 13: Efeito da administração oral da fração acetato de etila da casca dos frutos de *Annona crassiflora* na infiltração de células polimorfonucleares. Microfotografias ópticas representativas do tecido da pata de camundongos

tratados apenas com veículo (10 mL/kg) (a), 4 h após injeção intraplantar de CFA (b), e 4 h após injeção intraplantar de CFA e 4,5 h após tratamento com a fração AcEt (30 mg/kg) (c). Gráfico representativo do número de células polimorfonucleares por campo (d). Cada coluna representa a média + erro padrão da média para 4 animais. ANOVA unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, $##p < 0,001$ comparado ao grupo veículo, $***p < 0,001$ comparado ao grupo que recebeu apenas a injeção intraplantar de CFA. Nota: AcEt: fração de acetato de etila.

4.3.4. Coordenação motora nos testes de campo aberto e rotarod

A Tabela 1 mostra que o desempenho motor não foi significativamente influenciado pelo tratamento com a fração acetato de etila (30 mg/kg) em comparação com o grupo veículo.

Tabela 1. Atividade locomotora espontânea (campo aberto) e forçada (rotarod) observada 1 e 2 h, respectivamente, após a administração do veículo (10 mL/kg), fração acetato de etila (30 mg/kg) ou controle positivo Diazepam (10 mg/kg) ($n = 4$). Resultados expressos como média \pm erro padrão da média. ANOVA seguida pelo teste post hoc de Tukey, $*p < 0,05$ comparado ao grupo veículo.

Tratamento	Campo aberto		Rotarod
	Cruzamentos	Levantamentos	Latência à 1^a queda
Veículo (10 mL/kg)	45.3 \pm 8.6	11.3 \pm 2.7	120 \pm 6 s
Fração acetato de etila (30 mg/kg)	53.2 \pm 2.6	10.5 \pm 2.2	120 \pm 10 s
Diazepam (10 mg/kg)	-	-	42 \pm 16* s

4.4. Propriedades hepatoprotetoras da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *A. crassiflora* contra o estresse oxidativo e nitrosativo induzido pelo diabetes

4.4.1. Massa corpórea e parâmetros glicêmicos

A massa corpórea média dos ratos diabéticos (D) foi inferior ao dos controles não diabéticos (ND) ($p < 0,001$) (Tabela 2). O tratamento com a fração

n-butanol não alterou esse parâmetro nos ratos diabéticos; os ratos tratados com insulina (DI) apresentaram aumento da massa corpórea ($p < 0,05$). Após 30 dias de tratamento, o nível de glicose no sangue dos ratos tratados com 100 mg/kg da fração (D100) e do grupo DI diminuiu quando comparados ao grupo D ($p < 0,05$ e $p < 0,001$, respectivamente); as demais doses testadas da fração não foram capazes de reduzir esse parâmetro (Tabela 2).

Tabela 2: Massa corpórea e níveis glicêmicos de ratos não diabéticos (ND), ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (D) e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que foram tratados com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D25, D50 e D100, respectivamente) ou insulina (DI), avaliados 7 dias após a administração de estreptozotocina e 30 dias após o tratamento.

	Massa corpórea inicial (g)	Massa corpórea final (g)	Glicemia inicial (mg/dL)	Glicemia final (mg/dL)
ND	290,8 ± 10,8	348,7 ± 12,2 ^b	66,1 ± 2,3	56,1 ± 3,0 ^c
D	270,8 ± 9,6	271,7 ± 7,2	465,1 ± 29,0	560,7 ± 18,9
D25	257,3 ± 5,3	254,1 ± 7,0	434,9 ± 26,0	446,5 ± 50,7
D50	279,4 ± 8,2	280,4 ± 11,8	443,0 ± 32,5	441,8 ± 36,9
D100	274,8 ± 2,4	272,8 ± 9,6	437,9 ± 28,9	422,8 ± 44,6 ^a
DI	260,4 ± 5,7	308,7 ± 6,1 ^a	437,4 ± 27,2	147,5 ± 46,6 ^c

Valores expressos como media ± erro padrão da média. ^a $p < 0,05$ versus grupo D,

^b $p < 0,01$ versus grupo D e ^c $p < 0,001$ versus grupo D.

4.4.2. Parâmetros bioquímicos séricos

Os parâmetros bioquímicos séricos são mostrados na Tabela 3. Os ratos diabéticos (D) apresentaram maior atividade das enzimas ALT ($p < 0,001$), AST ($p < 0,001$), γ -GT ($p < 0,01$) e ALP ($p < 0,001$) e um maior nível de triglicerídeos ($p < 0,05$) quando comparados com os ratos não diabéticos (ND). Os tratamentos com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol (D25, D50 e D100, respectivamente) reduziram as atividades de ALT e AST ($p < 0,01$), enquanto que o tratamento com 50 mg/kg (D50) reduziu a atividade de ALP ($p < 0,001$), em comparação com os ratos diabético. Essas reduções também foram observadas com o tratamento com

insulina. No entanto, a fração e a insulina não reduziram a atividade de γ -GT e os níveis de triglicerídeos. O colesterol total e o HDL não apresentaram diferenças significativas entre os grupos.

Tabela 3: Parâmetros bioquímicos séricos de ratos não diabéticos (ND), ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (D), e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D25, D50 e D100, respectivamente) ou insulina (DI).

	ND	D	D25	D50	D100	DI
ALT (U/L)	56,3 ± 3,3 ^c	143,2 ± 13,1	89,5 ± 7,2 ^c	100,8 ± 10,1 ^b	94,5 ± 11,6 ^b	56,0 ± 2,6 ^c
AST (U/L)	129,6 ± 8,6 ^c	282,8 ± 7,2	129,8 ± 15,8 ^c	176,5 ± 50,3 ^c	184,7 ± 25,0 ^b	113,2 ± 10,3 ^c
γ -GT (U/L)	4,7 ± 1,0 ^b	16,6 ± 2,3	7,8 ± 2,4	8,5 ± 2,1	6,5 ± 3,5	10,5 ± 3,7
ALP (U/L)	170,8 ± 24,6 ^c	409,0 ± 61,3	302,4 ± 48,4	191,5 ± 23,8 ^c	353,3 ± 55,4	155,5 ± 11,5 ^c
Triglicerídeos (mg/dL)	58,1 ± 10,6 ^a	159,3 ± 28,1	124,2 ± 21,4	131,6 ± 22,0	117,0 ± 16,5	163,4 ± 26,6
Colesterol (mg/dL)	54,4 ± 2,6	62,6 ± 2,9	50,6 ± 3,2	60,1 ± 4,3	56,6 ± 2,3	62,0 ± 4,8
Colesterol HDL (mg/dL)	22,0 ± 0,5	22,5 ± 1,9	24,0 ± 0,9	26,1 ± 2,2	26,2 ± 1,7	27,6 ± 1,1

Valores expressos em média ± erro padrão da média. ^ap < 0,05 versus grupo D, ^bp < 0,01 versus grupo D e ^cp < 0,001 versus grupo D. Nota: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), γ -glutariltransferase (γ -GT) e fosfatase alcalina (ALP).

4.4.3. Análise dos marcadores de estresse oxidativo

Os ratos diabéticos apresentaram menor atividade antioxidante hepática que os não diabéticos ($p < 0,01$). O tratamento dos animais diabéticos com 50 mg/kg da fração *n*-butanol recuperou a capacidade antioxidante no fígado ($p < 0,01$), quando comparado com os ratos diabéticos não tratados (Figura 14a). Além disso, o diabetes induziu a peroxidação lipídica e elevou o conteúdo de proteínas carboniladas ($p < 0,01$) (Figuras 14b e 14c, respectivamente). Todas as doses da fração (25, 50 e 100 mg/kg) foram capazes de reduzir a peroxidação lipídica ($p < 0,05$), enquanto que as doses de 50 e 100 mg/kg reduziram o conteúdo de proteínas carboniladas no fígado ($p < 0,05$), em comparação com os

ratos diabéticos não tratados. Os ratos diabéticos tratados com insulina não mostraram diferença na capacidade antioxidante total e no conteúdo de proteínas carboniladas.

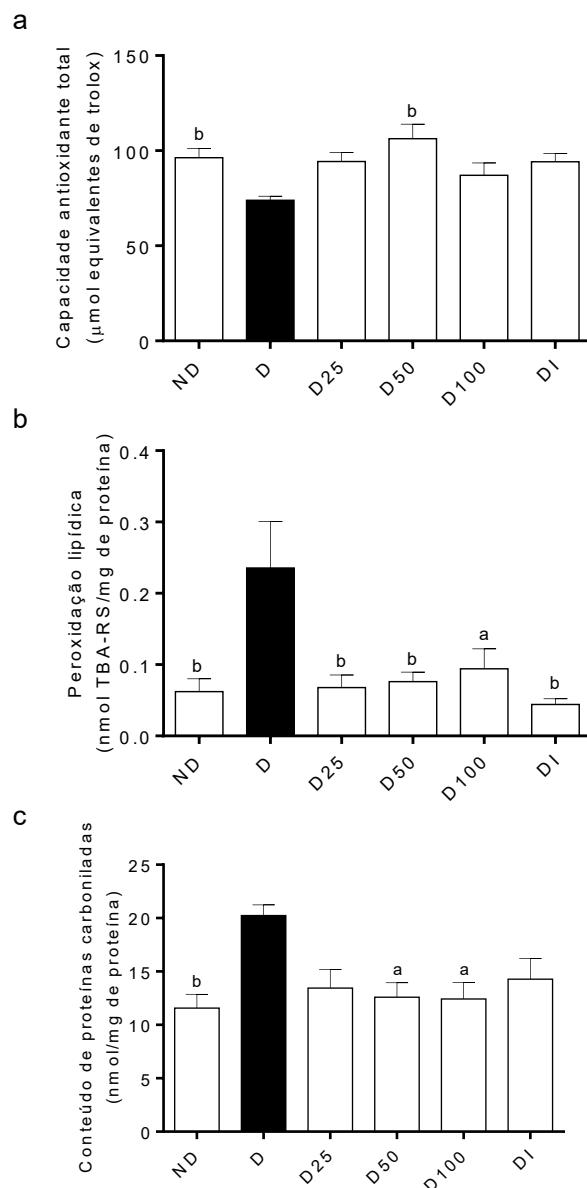


Figura 14: Análise da capacidade antioxidante total (a), peroxidação lipídica (b) e conteúdo de proteínas carboniladas (C) no fígado de ratos não diabéticos (ND), diabéticos induzidos por estreptozotocina (D) e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que foram tratados durante 30 dias com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D₂₅, D₅₀ e D₁₀₀, respectivamente) ou insulina (DI). Valores expressos em média + erro padrão da

média. ANOVA unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, ^a $p < 0,05$ versus grupo D, ^b $p < 0,01$ versus grupo D e ^c $p < 0,001$ versus grupo D.

O conteúdo e as atividades das enzimas antioxidantes hepáticas são mostrados na Figura 15. Os conteúdos de GPx, SOD e CAT foram maiores nos ratos D do que nos ratos ND ($p < 0,05$) (Figuras 15a, 15c e 15e, respectivamente). Todas as doses da fração *n*-butanol (25, 50 e 100 mg/kg) reduziram as concentrações de SOD ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,01$, respectivamente) e CAT ($p < 0,05$), enquanto que as doses de 50 e 100 mg/kg reduziram o conteúdo de GPx ($p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Além disso, as atividades de SOD e CAT foram maiores no grupo D do que no grupo ND ($p < 0,05$) (Figuras 15d e 15f, respectivamente). No entanto, os grupos D25, D50 e D100 apresentaram reduções nas atividades de SOD e CAT quando comparados aos ratos do grupo D ($p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,05$, respectivamente). Embora os ratos não diabéticos não tenham demonstrado diferença na atividade da GPx em relação aos ratos diabéticos não tratados (Figura 15b), os diabéticos tratados com todas as doses da fração *n*-butanol apresentaram menor atividade da GPx ($p < 0,05$). O tratamento de ratos diabéticos com insulina reduziu apenas o conteúdo de GPx ($p < 0,01$).

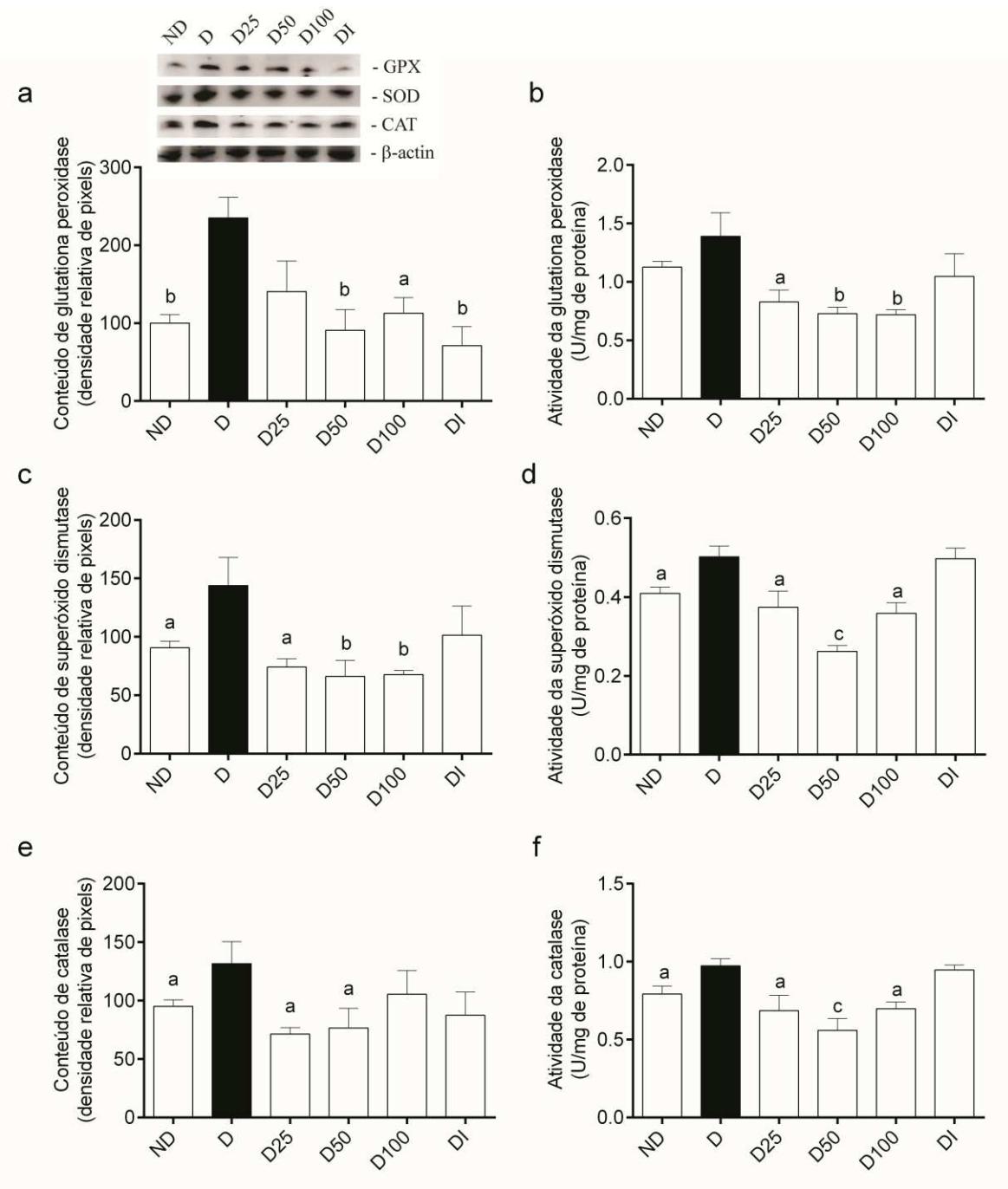


Figura 15: Análise do conteúdo (a) e atividade (b) de glutationa peroxidase, conteúdo (c) e atividade (d) de superóxido dismutase, e conteúdo (e) e atividade (f) de catalase no fígado de ratos não diabéticos (ND), ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (D) e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que foram tratados durante 30 dias com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D25, D50 e D100, respectivamente) ou insulina (DI). Valores expressos em média + erro padrão da média. ANOVA

unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, ^a $p < 0,05$ versus grupo D, ^b $p < 0,01$ versus grupo D e ^c $p < 0,001$ versus grupo D.

As atividades da GR e G6PDH e o conteúdo de GSH estão representados na Figura 16.

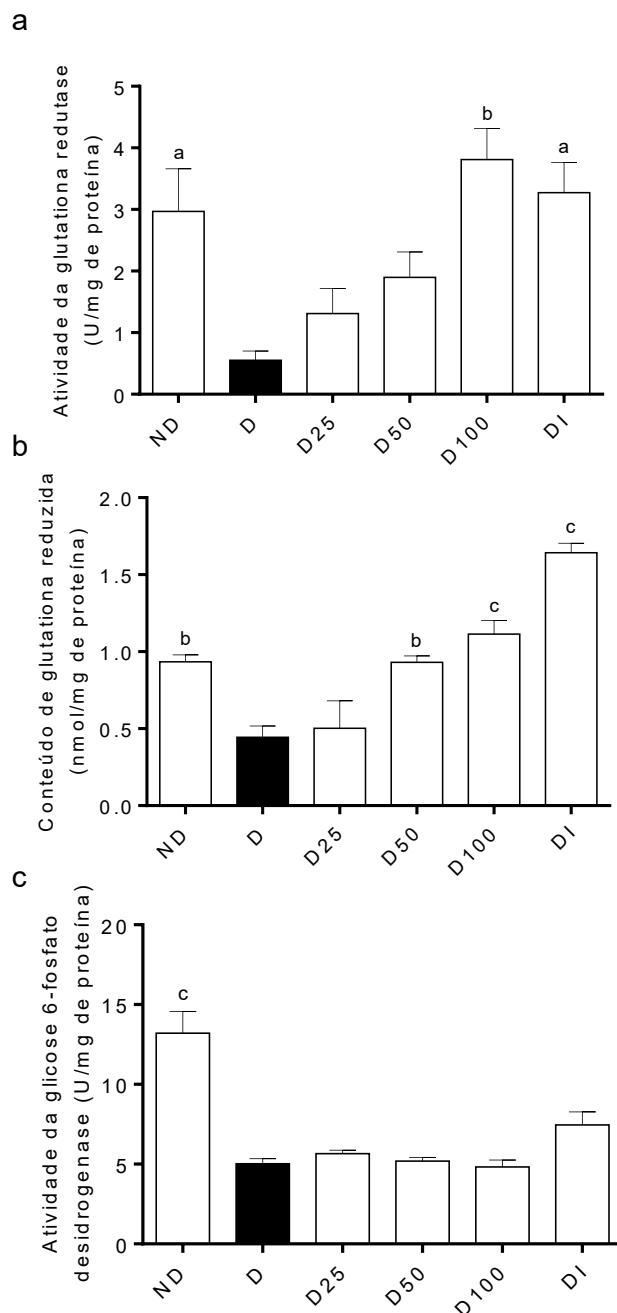


Figura 16: Análise da atividade da glutationa redutase (a), conteúdo de glutationa reduzida (b) e atividade da glicose 6-fosfato desidrogenase (c) no fígado de ratos

não diabéticos (ND), ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (D), e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que foram tratados durante 30 dias com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D25, D50 e D100, respectivamente) ou insulina (DI). Valores expressos em média + erro padrão da média. ANOVA unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, ^a*p* < 0,05 versus grupo D, ^b*p* < 0,01 versus grupo D e ^c*p* < 0,001 versus grupo D.

A atividade da GR hepática e o conteúdo de GSH foram menores nos ratos diabéticos não tratados (D) (*p* < 0,05 e *p* < 0,01, respectivamente) (Figuras 16a e 16b). O tratamento com 100 mg/kg da fração *n*-butanol e o tratamento com insulina (D100 e DI, respectivamente) impediram a redução da atividade da GR (*p* < 0,01 e *p* < 0,05, respectivamente) e, consequentemente, o conteúdo de GSH (*p* < 0,001). Além disso, a atividade da G6PDH foi menor no grupo D do que no grupo ND (*p* < 0,001) (Figura 16c); entretanto, os ratos tratados com a fração (D25, D50 e D100 mg/kg) e os ratos tratados com insulina (DI) não apresentaram diferença na atividade da G6PDH em relação ao grupo D.

4.4.4. Análise dos marcadores de estresse nitrosativo

Os conteúdos hepáticos de iNOS e N-Tir são mostrados na Figura 17. Os ratos diabéticos não tratados (D) apresentaram maior conteúdo de iNOS do que os não diabéticos (ND) (*p* < 0,05). Os tratamentos dos ratos diabéticos com 25 e 50 mg/kg da fração *n*-butanol reduziram o nível de iNOS (*p* < 0,05) (Figura 17a). Em relação à nitratação de proteínas (Figura 17b), não houve diferença no conteúdo de N-Tir entre os ratos não diabéticos e diabéticos não tratados. No entanto, os ratos diabéticos tratados com 50 e 100 mg/kg da fração e tratados com insulina apresentaram menor conteúdo de N-Tyr do que os ratos diabéticos não tratados (*p* < 0,05).

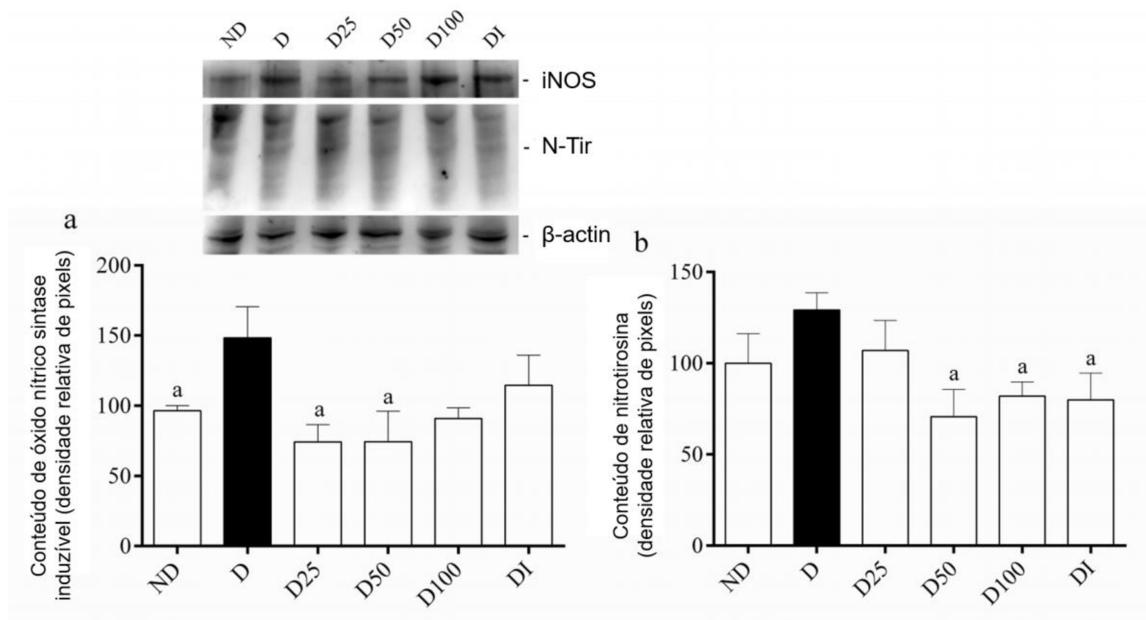


Figura 17: Análise do conteúdo de óxido nítrico sintase induzível (iNOs) (a) e nitrotirosina (N-Tir) (b) no fígado de ratos não diabéticos (ND), ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (D), e ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina que foram tratados durante 30 dias com 25, 50 e 100 mg/kg da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* (D25, D50 e D100, respectivamente) ou insulina (DI). Valores expressos em média + erro padrão da média. ANOVA unidirecional seguida por Dunnett como pós-teste, ^a $p < 0,05$ versus grupo D.

4.4.5. Análise histológica

A análise das fatias de fígado coradas com HE (Figura 18) mostrou uma preservação geral da histoarquitetura hepática, hepatócitos com aspecto eosinofílico citoplasmático normal e um ou dois núcleos com cromatina solta e nucléolo evidente. Dois indivíduos do grupo D25 apresentaram sinusoides dilatados, apesar de não serem observados outros sinais visuais de hepatotoxicidade.

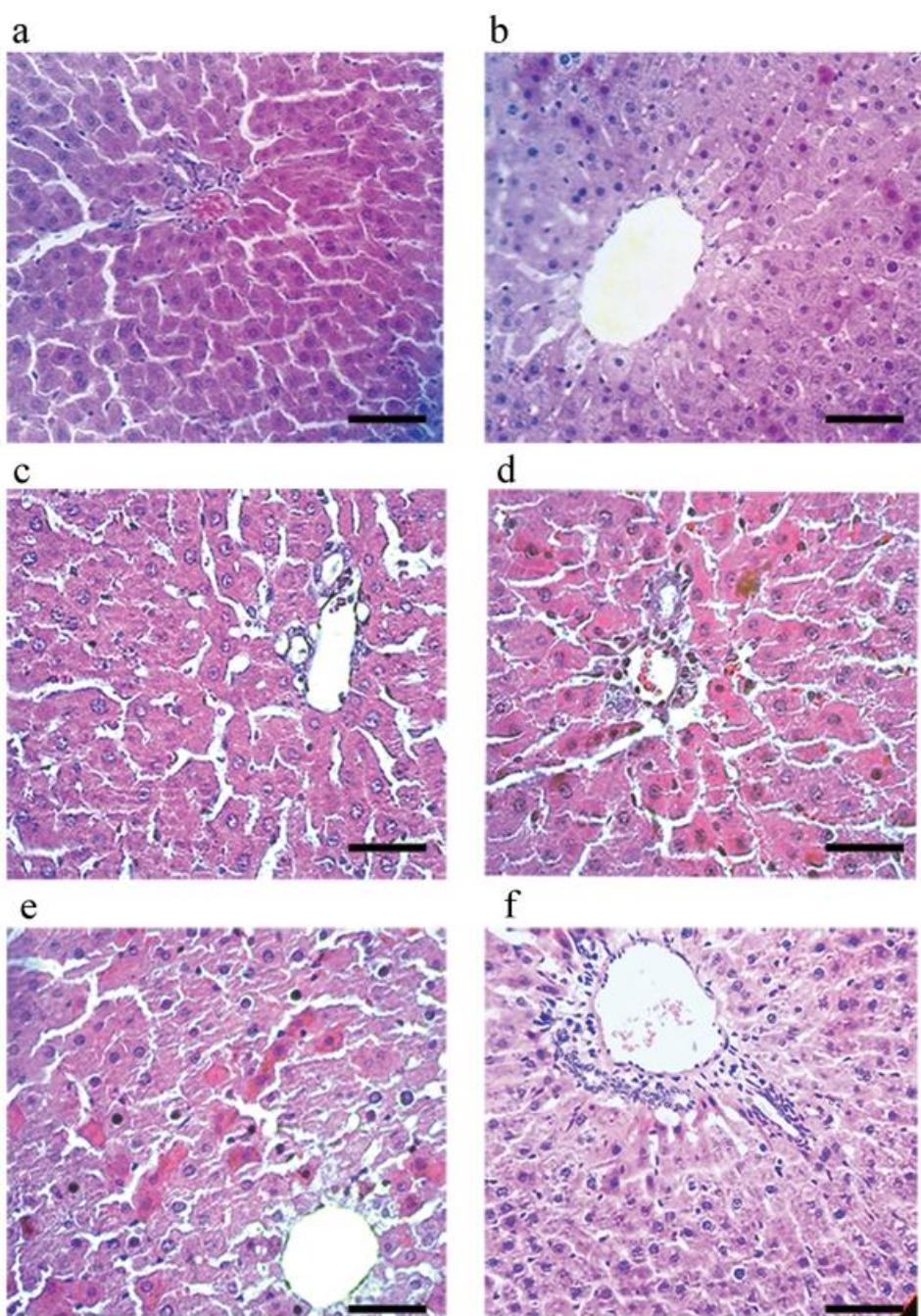


Figura 18: Fotomicrografias de cortes hepáticos de ratos não diabéticos (a), diabéticos induzidos por estreptozotocina não tratados (b), diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com 25 mg/kg (c), 50 mg/kg (d) e 100 mg/kg (e) da fração *n*-butanol da casca dos frutos de *Annona crassiflora* ou insulina (f). HE (barra de escala para a-f = 50 μm). A veia central é mostrada em todas as imagens.

4.5. Predição das propriedades farmacocinéticas *in silico*

A predição de propriedades farmacocinéticas da procianidina B2, epicatequina, catequina, ácido clorogênico e cafeoil-glicosídeo é mostrada na Tabela 4. Todos os compostos apresentaram absorção intestinal acima de 40%, valores de fração não ligada superiores a 0,2 Fu e não tiveram interferência sobre o metabolismo pela não inibição de enzimas do citocromo P. A absorção intestinal prevista foi baseada nos compostos originais. Além disso, epicatequina e catequina apresentaram valores de Vdss acima de 0,7 L/kg, indicando biodistribuição maior nos tecidos do que no plasma. O ácido clorogênico apresentou baixo volume de distribuição, indicando uma alta ligação às proteínas plasmáticas e/ou não distribuição aos tecidos. Todos os polifenóis apresentaram valores baixos de toxicidade aguda por via oral ($LD_{50} < 2,5$ mol/kg) e de toxicidade crônica por via oral ($LOAEL < \log 4,4$ mg/kg/dia), e não apresentaram hepatotoxicidade.

Tabela 4: Propriedades farmacocinéticas *in silico* para procianidina B2, epicatequina, catequina, ácido clorogênico e cafeoil-glicosídeo. Absorção intestinal, volume de distribuição no estado estacionário (Vdss), fração não ligada, inibição das enzimas do citocromo P (CYP), toxicidade aguda (LD_{50}) e crônica ($LOAEL$) em ratos por via oral e análise de hepatotoxicidade.

Composto	Absorção intestinal (% absorvida)	Vdss (L/kg)	Fração não ligada (Fu)	Inibição de CYP	LD_{50} (mol/kg)	LOAEL (log mg/kg/dia)	Hepatotoxicidade
Procianidina B2	60,38	0,132	0,249	Não	2,483	4,18	Não
Epicatequina	69,21	1,346	0,373	Não	2,331	2,99	Não
Catequina	69,21	1,346	0,373	Não	2,331	2,99	Não
Ácido clorogênico	42,52	-0,955	0,579	Não	1,993	4,35	Não
Cafeoil-glicosídeo	50,44	0,141	0,616	Não	1,920	4,34	Não

Nota: enzimas do citocromo P: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 and CYP3A4.

5. Discussão

A busca por compostos bioativos naturais de baixa toxicidade e com capacidades antioxidantes e anti-inflamatórias tem ganhado destaque no controle e tratamento de diversas condições fisiopatológicas, quando comparados aos compostos sintéticos (BAHADORAN; MIRMIAN; AZIZI, 2013; BEDEKAR; SHAH; KOFFAS, 2010; MAROON; BOST; MAROON, 2010; PANDEY; RIZVI, 2009; QUINTANS; ANTONIOLLI; ALMEIDA *et al.*, 2014). Plantas inteiras ou misturas/extratos de plantas podem ser alternativas ao invés de compostos isolados devido à fácil acessibilidade em relação à aquisição de moléculas isoladas (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009). Além disso, a interação sinérgica ou efeitos multifatoriais entre os compostos presentes nos extratos podem aumentar os seus efeitos biológicos (WAGNER; ULRICH-MERZENICH, 2009).

Annona crassiflora Mart. é uma planta medicinal popularmente usada no tratamento de doenças inflamatórias e dolorosas, como reumatismo, feridas, doenças venéreas, picadas de cobra e infecções microbianas (SILVA; CERDEIRA; CHAVASCO *et al.*, 2014; VILAR; FERREIRA; FERRI *et al.*, 2008). No entanto, pouco é mostrado na literatura sobre os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e analgésicos dessa planta, mais especificamente da casca de seus frutos. Assim, buscamos avaliar os possíveis mecanismos que a casca dos frutos pode exercer em modelos *in vitro* e *in vivo* de dor inflamatória aguda e tardia, e modelo *in vivo* de estresse oxidativo e nitrosativo.

Frações ricas em polifenóis foram obtidas a partir de uma partição líquido-líquido do extrato bruto etanólico da casca dos frutos de *A. crassiflora*. Foram demonstrados pela primeira vez os efeitos protetores das frações acetato de etila e *n*-butanol na produção de IL-6 e NO a partir de macrófagos ativados por LPS. Além disso, também foram observados os efeitos antinociceptivos da fração acetato de etila na nociceção induzida por glutamato, assim como na dor inflamatória aguda e tardia induzida por CFA em camundongos. Este estudo relatou também o efeito hepatoprotetor da fração *n*-butanol, avaliando seus efeitos antioxidantes e antinitrosativos no tecido hepático de ratos diabéticos.

Um estudo anterior mostrou a presença dos principais compostos fenólicos nas frações polares acetato de etila e *n*-butanol, como ácido quinínico, cafeoil-glicosídeo, (epi) catequina, procianidina B2 e feruloil-galactosídeo, identificados em ambas as frações (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). Além disso, procianidina C1, queracetina-glicosídeo, kaempferol-rutinosídeo e kaempferol-glicosídeo foram identificados na fração acetato de etila, enquanto que os ácidos cítrico e clorogênico foram identificados apenas na fração *n*-butanol (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). A caracterização fitoquímica das frações acetato de etila e *n*-butanol das cascas dos frutos de *A. crassiflora* utilizando CLAE-ESI-EM/EM corroborou seu alto conteúdo de fenois totais, flavonoides e proantocianidinas (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016), que podem contribuir para a melhoria observada nos parâmetros nociceptivos, inflamatórios e antioxidantes. Além disso, as frações mais apolares *n*-hexano e diclorometano também foram analisadas previamente, mostrando a presença de alcaloides, sendo a estefalagina o principal alcaloide aporfínico da casca dos frutos (JUSTINO; BARBOSA; NEVES *et al.*, 2020; PEREIRA; JUSTINO; MARTINS *et al.*, 2017).

Interessantemente, a fração alcaloidal diclorometano estimulou a produção de NO nos macrófagos. Alguns estudos mostraram o papel dos alcaloides aporfínicos na produção de NO via NO sintase induzível (CHANG; CHUNG; WU *et al.*, 2004; LAU; LING; MURUGAN *et al.*, 2015; ZHU; QIAN, 2006). A fração *n*-butanol também aumentou os níveis de NO nos macrófagos, o que pode ser atribuído à presença de ácido clorogênico, uma vez que estudos anteriores mostraram que esse composto fenólico aumenta a produção de NO (JIANG; HODGSON; MAS *et al.*, 2016; YAMAGATA, 2018).

Vários estudos sugerem que mediadores inflamatórios como citocinas e NO são importantes para dor aguda e crônica nos níveis periférico e central (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; DA SILVA; PASZCUK; PASSOS *et al.*, 2011; ROSSATO; HOFFMEISTER; TREVISAN *et al.*, 2019; SINGH; VINAYAK, 2015; SPILLER; OLIVEIRA FORMIGA; FERNANDES DA SILVA COIMBRA *et al.*, 2019). Dessa forma, primeiramente foi observado que a fração acetato de etila da casca dos frutos de *A. crassiflora* foi capaz de reduzir a produção de NO e IL-6 nos macrófagos estimulados por LPS. No entanto, isso não foi observado para o

TNF- α . Estas são citocinas diferentes, com vias de sinalização distintas, portanto, uma fração extraída de um produto natural em que moléculas diferentes podem ser encontradas não necessariamente inibirá todas as citocinas inflamatórias. Em conformidade, um grande número de compostos fenólicos foi relatado para inibir a secreção e expressão de citocinas pró-inflamatórias e modular a biodisponibilidade do NO, agindo sobre a expressão e/ou atividade das enzimas produtoras de NO (DUARTE; FRANCISCO; PEREZ-VIZCAINO, 2014; LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016).

Alguns estudos demonstraram que proantocianidinas e flavonoides, como os encontrados na fração acetato de etila, como catequina, kaempferol e quercetina, incluindo suas formas glicosiladas, reduziram os níveis de NO, IL-6 e TNF- α em macrófagos estimulados por LPS (LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016). Os efeitos anti-inflamatórios dos flavonoides pela inibição da expressão e secreção de citocinas e NO estão envolvidos na modulação de fatores transpcionais, como o fator nuclear kappa B (NF- κ B, do inglês *nuclear factor kappa B*) e a proteína ativadora 1 (AP-1, do inglês *activator protein 1*), e a inibição da iNOS, respectivamente (DUARTE; FRANCISCO; PEREZ-VIZCAINO, 2014; HÄMÄLÄINEN; NIEMINEN; VUORELA *et al.*, 2007; LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016; LIMTRAKUL; YODKEEREE; PITCHAKARN *et al.*, 2016; OLSZANECKI; GEBSKA; KOZLOVSKI *et al.*, 2002).

Estudos têm mostrado que os polifenóis derivados de plantas, especificamente flavonoides, têm efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios em diferentes modelos de dor, com modulação dos receptores de glutamato e da produção de NO e citocinas pró-inflamatórias (DE OLIVEIRA; ZAMBERLAM; RÊGO *et al.*, 2016; DUARTE; FRANCISCO; PEREZ-VIZCAINO, 2014; LEYVA-LOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016). Assim, o potencial antinociceptivo da fração acetato de etila foi investigado em um modelo de nocicepção aguda induzida por glutamato. A fração nas doses de 30 e 100 mg/kg foi capaz de reduzir a dor induzida pelo glutamato quando administrada por via oral. O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório no sistema nervoso central (CODERRE, 1993). Os receptores de glutamato são importantes na neurotransmissão nociceptiva periférica, espinhal e supraespinhal, que é

mediada pelos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e receptores não NMDA, assim como pela liberação de NO, os quais podem produzir hiperalgesia (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

Os efeitos antinociceptivos da fração acetato de etila podem ser atribuídos à presença de flavonoides (ALI KHAN; AHMED; MISBAH *et al.*, 2018). Tem relatos na literatura que mostram que a querctina e a epicatequina, presentes na fração, inibem a nocicepção induzida por glutamato por meio de mecanismos que envolvem interação com a via de produção de NO via L-arginina, com serotonina e sistemas GABAérgicos (FILHO; FILHO; OLINGER *et al.*, 2008; LOPES; MARQUES; FERNANDES *et al.*, 2012). Portanto, um efeito da fração rica em polifenóis diretamente nos receptores ou segundos mensageiros relacionados a esses transmissores pode evitar a resposta nociceptiva. O efeito da casca dos frutos de *A. crassiflora* contra a nocicepção induzida pelo glutamato é de grande interesse, uma vez que o glutamato desempenha um papel significativo no processamento nociceptivo no sistema nervoso central e periférico (MILLAN, 1999).

Interessantemente, os efeitos antinociceptivos/anti-inflamatórios foram observados quando a fração acetato de etila foi administrada dentro de um intervalo de doses limitado. Isso pode ser justificado pelo fato de que essas atividades não são alcançadas pelos principais compostos presentes na fração em doses mais baixas. Além disso, quando a quantidade da fração excedeu um certo ponto, seu impacto terapêutico diminuiu. Em altas doses, pode haver efeitos antagônicos entre os compostos presentes na fração, locais de ligação múltipla ou alvos múltiplos que formam agregados coloidais, os quais podem contribuir para a perda de atividade em concentrações mais altas (OWEN; DOAK; GANESH *et al.*, 2014).

Os potenciais efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório da fração acetato de etila também foram explorados em um modelo de dor aguda e tardia inflamatória induzida por CFA. Estímulos inflamatórios, como o CFA, induzem a uma cascata de mediadores inflamatórios, como citocinas, resultando em hiperalgesia inflamatória, que é a intensidade da dor exacerbada, e alodinia, que é a dor à estímulos inócuos (CUNHA; VERRI; SILVA *et al.*, 2005; LOESER; TREDEE, 2008). De acordo a hipótese desse trabalho, o tratamento da fração

acetato de etila a 30 mg/kg reduziu a alodinia aguda e tardia induzida pelo CFA, estando de acordo com os efeitos antinociceptivos da fração no modelo de nocicepção induzida por glutamato. Além disso, a fração rica em polifenóis diminuiu a resposta de hiperalgesia ao frio em camundongos injetados com CFA. Vale ressaltar que o estresse oxidativo é um componente importante da dor inflamatória (CAI; HUANG; ZHAO *et al.*, 2013). Foi demonstrado que a terapia antioxidante e os “sequestradores” de ROS são considerados por suas possíveis atividades antinociceptivas (CAI; HUANG; ZHAO *et al.*, 2013; SINGH; VINAYAK, 2015; TREVISAN; ROSSATO; TONELLO *et al.*, 2014). Nesse sentido, foi observado anteriormente o potencial antioxidante da fração acetato de etila (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016).

Os camundongos que receberam a injeção intraplantar de CFA apresentaram um aumento acentuado na espessura da pata, que foi revertida pela fração acetato de etila na fase aguda da inflamação. É importante ressaltar que o tratamento com a fração foi capaz de reduzir não só o edema da pata, mas também impedir a infiltração de neutrófilos induzida pelo CFA. O aumento da atividade da mieloperoxidase (que é uma evidência indireta da infiltração de neutrófilos) foi observado no tecido da pata inflamada 4 h após a injeção de CFA. De acordo os resultados de atividade da MPO, a infiltração celular também foi confirmada por análise histológica, demonstrando a infiltração de leucócitos, pelo menos até 4 h após a injeção de CFA. A administração oral da fração acetato de etila a 30 mg/kg reduziu a atividade da MPO, o que foi reforçado pelas análises histológicas que mostraram uma redução nas células inflamatórias infiltradas nos camundongos injetados com CFA e tratados com a fração. Assim, a ação antinociceptiva da fração acetato de etila parece estar associada a uma ação anti-inflamatória local. Os resultados sugerem que a fração rica em polifenóis da casca dos frutos de *A. crassiflora* apresenta notáveis atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas que podem ser mediadas pela supressão de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de neutrófilos.

Esses efeitos anti-inflamatórios observados nas frações da casca dos frutos de *A. crassiflora* podem ter sido mediados por proantocianidinas e flavonoides presentes na fração rica em polifenóis, como a quercetina e a catequina, que anteriormente mostraram efeitos significativos no processo crônico

e subcrônico da artrite e desempenharam um papel inibindo a liberação de NO, IL-1 e IL-6 (GUARDIA; ROTELLI; JUAREZ *et al.*, 2001; JHUN; MOON; YOON *et al.*, 2013). O mecanismo anti-inflamatório dos flavonoides é atribuído às suas estruturas químicas, por exemplo, um sistema de anéis planares na molécula, insaturaçao no anel C na posição C2-C3 e o número e a posição dos grupos OH nos anéis A e B (HÄMÄLÄINEN; NIEMINEN; VUORELA *et al.*, 2007; LEYVALOPEZ; GUTIERREZ-GRIJALVA; AMBRIZ-PEREZ *et al.*, 2016). Portanto, ser capaz de regular negativamente a expressão e secreção de citocinas representa uma alternativa muito promissora para ser usada como tratamento de doenças inflamatórias, como a artrite.

Também é importante notar que a fração acetato de etila a 30 mg/kg não demonstrou alterações nas atividades locomotoras de camundongos, como evidenciado pelos testes de campo aberto e rotarod. Além disso, foi demonstrado em um estudo anterior que a fração acetato de etila não possui citotoxicidade quando analisada pelo teste MTT *in vitro* em células de fibroblastos NIH/3T3 (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016).

Para a avaliação do estresse oxidativo e nitrosativo, o modelo de indução da hiperglicemia por estreptozotocina foi utilizado em ratos Wistar. A estreptozotocina danifica as células β pancreáticas e resulta em diabetes *mellitus*, caracterizada por hiperglicemia associada ao aumento da produção de ROS e RNS (LI; TAN; WANG *et al.*, 2015). Os animais diabéticos apresentaram reduções na massa corporal reduzida, capacidade antioxidante total, conteúdo de GSH e atividades de GR e G6PDH. Além disso, houve aumentos na glicemia, nível de triglicerídeos, ALT, AST, γ -GT e ALP, assim como nos conteúdos e atividades de SOD, CAT, GPx e iNOS.

A fração *n*-butanol foi escolhida para o modelo de estresse oxidativo e nitrosativo induzido por hiperglicemia por ter apresentado maior capacidade antioxidante *in vitro* (DPPH IC₅₀ 0,8 ± 0,1 µg/mL, ORAC 2714 ± 79 µmol equivalentes de trolox/g e FRAP 921 ± 9 µmol equivalentes de trolox/g) e maior conteúdo de flavonoides (45,3 ± 4,2 mg de equivalentes de quercetina/g), em relação às outras frações e ao extrato bruto, como demonstrado em um estudo anterior (JUSTINO; PEREIRA; VILELA *et al.*, 2016). Esses resultados prévios corroboram a melhora observada nos parâmetros de estresse oxidativo/nitrosativo

nos ratos hiperglicêmicos tratados com a fração *n*-butanol. Os flavonoides são considerados benéficos para a saúde humana, por contribuírem na prevenção de doenças crônico-degenerativas, por meio da redução do estresse oxidativo e nitrosativo e inibição da oxidação e a nitração das macromoléculas (CUMAOĞLU; CEVIK; RACKOVA *et al.*, 2007; VINAYAGAM; XU, 2015). Esses compostos são capazes de eliminar os radicais livres e quesar os metais, assim como modular a transcrição gênica e expressão de enzimas antioxidantes (CUMAOĞLU; CEVIK; RACKOVA *et al.*, 2007; DEY; LAKSHMANAN, 2013; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

A fração *n*-butanol não foi capaz de aumentar a massa corporal ou controlar a hiperglicemia de ratos diabéticos, indicando que esta não apresenta atividade mimética à insulina e/ou capacidade de reparo do tecido pancreático. No entanto, o tratamento com a fração *n*-butanol foi responsável por reduzir as atividades séricas de ALT, AST e ALP. Em relação aos parâmetros de estresse oxidativo e nitrosativo no tecido hepático dos ratos diabéticos tratados com a fração *n*-butanol, foram observadas reduções na peroxidação lipídica, carbonilação e nitração de proteínas e no conteúdo de iNOS, assim como nas atividades e conteúdos de GPx, SOD e CAT. Além disso, houve aumentos na capacidade antioxidante total, atividade de GR e níveis de GSH, e a histoarquitetura hepática foi preservada.

A hiperglicemia causa alterações estruturais e funcionais no fígado de animais diabéticos, conforme demonstrado por DEY e SWAMINATHAN (2010). No presente estudo, não houve alterações na histoarquitetura hepática dos ratos diabéticos; nenhuma evidência significativa de inflamação, necrose, fibrose, proliferação, destruição ou regeneração do parênquima foi observada. Isso pode ser explicado pelo fato de que os danos no tecido hepático devido ao diabetes ocorrem após um período crônico de cerca de 12 semanas (INOUE; OHTAKE; MOTOMURA *et al.*, 2005). O objetivo de avaliar animais diabéticos tratados com a fração *n*-butanol também foi elucidar possíveis efeitos hepatotóxicos por meio de análises de histoarquitetura, que é comum pelo uso de produtos naturais. No entanto, esse efeito não foi observado para essa fração.

Uma vez que os ratos diabéticos não apresentaram alterações na histoarquitetura hepática, a elevação das atividades séricas de ALT e AST pode

ser devida ao efeito prejudicial da hiperglicemia em outros órgãos, como músculo esquelético e rim. Entretanto, ALP e γ -GT aumentados em ratos diabéticos estão associados à colestase devido à obstrução biliar induzida pelo estresse (ROSALKI, 1975; WOLF, 1978). Todas as doses da fração *n*-butanol foram capazes de reduzir a atividade de ALT e AST, enquanto que a dose de 50 mg/kg reduziu a atividade da ALP. A normalização da AST, ALT e ALP pode ser devida à presença de flavonoides na fração, uma vez que estes são relatados como agentes hepatoprotetores (VINAYAGAM; XU, 2015). Além disso, os ratos diabéticos apresentaram maior nível de triglicerídeos que os não diabéticos, como consequência da deficiência de insulina e hiperglicemia (BRIONES; MAO; PALUMBO *et al.*, 1984). O tratamento com a fração *n*-butanol não foi capaz de reduzir os níveis de triglicerídeos, pois não teve efeito na hiperglicemia. Os níveis de colesterol total e HDL não apresentaram diferenças entre os ratos diabéticos e não diabéticos, corroborando dados de HOLMGREN e BROWN (1993).

Embora ROS e RNS não tenham sido medidos diretamente, os resultados mostraram um aumento na peroxidação lipídica e na carbonilação e nitração de proteínas, indicando que a hiperglicemia induzida por estreptozotocina foi capaz de reduzir a capacidade antioxidante e gerar espécies oxidativas e nitrosativas, fatores que desencadeiam a patogênese do diabetes *mellitus* crônico (PACHER; OBROSOVA; MABLEY *et al.*, 2005). A peroxidação lipídica aumenta sob a condição patológica do diabetes (DINIZ VILELA; GOMES PEIXOTO; TEIXEIRA *et al.*, 2016; LEE; KIM; CHO *et al.*, 2007). Sob condições hiperglicêmicas, a glicose oxida e produz superóxido, levando à produção de radicais livres que, por sua vez, causam peroxidação lipídica nas lipoproteínas, prejudicando suas funções devido à diminuição da fluidez da membrana (BANDEIRA SDE; GUEDES GDA; DA FONSECA *et al.*, 2012). A formação de equivalentes de malondialdeído foi menor nos ratos diabéticos tratados com a fração *n*-butanol. Estudos anteriores demonstraram o potencial do ácido clorogênico e proantocianidinas, que estão presentes na fração, na redução da peroxidação lipídica e no aumento da capacidade antioxidante em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (GU; HOUSE; WU *et al.*, 2006; LEE; KIM; CHO *et al.*, 2007; YE; LI; ZHENG *et al.*, 2016).

As ROS e RNS também podem danificar proteínas. Os principais mecanismos moleculares que levam ao dano proteico são a oxidação caracterizada pela formação de carbonilas e nitrotirosinas e a perda de grupos tiol (CUMAOĞLU; CEVIK; RACKOVA *et al.*, 2007; DEAN; FU; STOCKER *et al.*, 1997; PACHER; OBROSOVA; MABLEY *et al.*, 2005). A conversão de proteínas em derivados de proteínas carboniladas por oxidação direta causada por ROS pode alterar várias funções celulares (DEAN; FU; STOCKER *et al.*, 1997). No presente estudo, os ratos diabéticos não tratados apresentaram maior conteúdo de proteínas carboniladas do que os não diabéticos, corroborando os resultados de CUMAOĞLU; CEVIK; RACKOVA *et al.* (2007) e JANG; SONG; SHIN *et al.* (2000). A administração da fração *n*-butanol foi capaz de reduzir a carbonilação de proteínas no fígado. Um estudo realizado por TABASSUM; PARVEZ; REHMAN *et al.* (2007) mostrou que a catequina, um flavonoide previamente identificado nessa fração, impediu a carbonilação de proteínas no fígado, indicando seu potencial em inibir a formação de proteínas carboniladas.

A atividade e o conteúdo de SOD, CAT e GPx também foram maiores nos ratos diabéticos não tratados do que nos ratos não diabéticos, em resposta ao aumento do estresse oxidativo hepático. O aumento da atividade de GPx e CAT pode ter ocorrido como resposta compensatória ao aumento da produção endógena de H₂O₂ no fígado dos ratos diabéticos, uma vez que a deficiência de insulina promove a oxidação de ácidos graxos com a consequente formação de H₂O₂ (HORIE; ISHII; SUGA, 1981). O aumento da atividade da SOD pode ter ocorrido devido ao aumento da produção de superóxido, com H₂O₂ atuando como indutor de SOD tecidual (DIAS; PORAWSKI; ALONSO *et al.*, 2005). O tratamento com a fração *n*-butanol contribuiu com a redução do conteúdo e da atividade dessas enzimas antioxidantes nos ratos diabéticos. Os compostos fenólicos presentes na fração, por meio de suas propriedades de eliminação de ROS, podem ter sido responsáveis pela prevenção da elevação de GPx, SOD e CAT no tecido hepático, uma vez que estudos mostram a atividade antioxidante de flavonoides contra o estresse oxidativo (COSKUN; KANTER; KORKMAZ *et al.*, 2005; DIAS; PORAWSKI; ALONSO *et al.*, 2005; LEE; KIM; CHO *et al.*, 2007).

Embora os níveis de GPx, SOD e CAT tenham aumentado no fígado dos ratos diabéticos não tratados, sua capacidade antioxidant total hepática foi

menor. Isso pode ser explicado pela redução na atividade de G6PDH e GR, assim como nos níveis de GSH, corroborando estudos anteriores (AL-NUMAIR; CHANDRAMOHAN; VEERAMANI *et al.*, 2015; DIAZ-FLORES; IBANEZ-HERNANDEZ; GALVAN *et al.*, 2006; MORAES; MANZAN-MARTINS; DE GOUVEIA *et al.*, 2015). A atividade reduzida de G6PDH observada no fígado dos ratos diabéticos pode ser explicada pela redução na secreção e ação da insulina, uma vez que a atividade da G6PDH hepática varia proporcionalmente de acordo com os níveis de insulina (DIAZ-FLORES; IBANEZ-HERNANDEZ; GALVAN *et al.*, 2006). A depleção do nível de GSH nos ratos diabéticos pode ser devido ao seu uso para aliviar o estresse oxidativo induzido pelo diabetes (COSKUN; KANTER; KORKMAZ *et al.*, 2005). Em relação ao tratamento com a fração *n*-butanol, os resultados mostraram que, quanto maior a dose, maior a atividade de GR e dos níveis de GSH.

Os polifenóis, especialmente as proantocianidinas, têm a capacidade de estimular a biossíntese de GSH e/ou reduzir o estresse oxidativo, levando a uma menor depleção de GSH, conforme relatado por AL-NUMAIR; CHANDRAMOHAN; VEERAMANI *et al.* (2015) e LEE; KIM; CHO *et al.* (2007). No entanto, a atividade da G6PDH permaneceu reduzida nos ratos diabéticos tratados com a fração *n*-butanol. Como os ratos tratados com a fração permaneceram hiperglicêmicos e com deficiência na secreção de insulina devido à estreptozotocina, a atividade da G6PDH continuou reduzida, mesmo usando doses crescentes da fração *n*-butanol.

O diabetes *mellitus* também pode levar ao aumento da expressão da iNOS hepática, como observado neste estudo. A formação de NO pode ser resultado da ativação de vias de sinalização sensíveis ao estresse, que podem causar danos celulares e complicações tardias do diabetes (PRABHAKAR, 2004). A combinação de NO com radicais superóxido (O_2^-) pode levar à formação de peroxinitrito (ONOO $^-$), cuja produção está associada à origem e progressão do dano oxidativo das proteínas (PACHER; BECKMAN; LIAUDET, 2007; PACHER; OBROSOVA; MABLEY *et al.*, 2005). A nitração na posição orto da tirosina é um dos principais produtos do ataque do ONOO $^-$ às proteínas, levando à formação de nitrotirosina (LI; TAN; WANG *et al.*, 2015; MADAR; KALET-LITMAN; STARK, 2005; PACHER; OBROSOVA; MABLEY *et al.*, 2005). O presente estudo mostrou

que os ratos diabéticos não tratados não apresentaram alteração significativa na expressão de nitrotirosina quando comparados aos não diabéticos, semelhante aos resultados encontrados por CHANG; CHANG; HUANG *et al.* (2012). No entanto, o tratamento utilizando a fração *n*-butanol reduziu a expressão de iNOS e nitrotirosina. Estudos anteriores demonstraram o potencial das proantocianidinas na regulação negativa da expressão da iNOS (DIAS; PORAWSKI; ALONSO *et al.*, 2005; KOWLURU; KOPPOLU; CHAKRABARTI *et al.*, 2003; LEE; KIM; CHO *et al.*, 2007), o que justifica a redução da iNOS observada nos ratos diabéticos tratados com a fração *n*-butanol.

As propriedades farmacocinéticas preditas de absorção, metabolismo e distribuição mostraram absorção intestinal favorável ($> 40\%$) para todos os compostos (PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B., 2015), corroborando os dados de OLTHOF; HOLLMAN e KATAN (2001), ACTIS-GORETTA; LEVEQUES; REIN *et al.* (2013) e SPENCER; SCHROETER; SHENOY *et al.* (2001), que mostraram valores semelhantes de absorção intestinal para ácido clorogênico, epicatequina e procianidina B2. Além disso, não houve interferência negativa sobre o metabolismo, uma vez que esses compostos não inibem as enzimas do citocromo P, como CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6 e CYP3A4. Os valores de fração não ligada foram acima de 0,24 Fu, indicando que os compostos da fração *n*-butanol não se ligam à proteínas plasmáticas (PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B., 2015). Os resultados de Vdss mostraram uma biodistribuição maior nos tecidos para catequina e epicatequina, e baixa biodistribuição para o ácido clorogênico; procianidina B2 e cafeoil-glicosídeo apresentaram distribuição uniforme (PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B., 2015). O Vdss é uma das medidas farmacocinéticas primárias do volume teórico para permitir a distribuição uniforme da dose total e fornecer a mesma concentração de um determinado composto no sangue e no tecido (YATES; ARUNDEL, 2008). Quanto à toxicidade, todos os compostos não apresentaram hepatotoxicidade e mostraram baixa toxicidade aguda e crônica por via oral, corroborando dados de SUNDARRAJAN e ARUMUGAM (2017) e YAMAKOSHI; SAITO; KATAOKA *et al.* (2002), que apresentaram baixos valores de LD50 para catequina e procianidina B2, respectivamente.

6. Conclusão

Os resultados apoiam os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da fração acetato de etila da casca dos frutos de *A. crassiflora* sem alterar a atividade motora e sugerem que esses efeitos são desencadeados pela supressão de citocinas pró-inflamatórias e infiltração de neutrófilos. Além disso, o tratamento com a fração *n*-butanol da casca dos frutos de *A. crassiflora* diminuiu as atividades de ALT, AST e ALP, peroxidação lipídica, carbonilação e nitração de proteínas e conteúdo de iNOS, além das atividades e conteúdos de GPx, SOD e CAT. Além disso, houve aumentos na capacidade antioxidante total, atividade de GR e níveis de GSH. Baixos teores de malondialdeído e proteínas carboniladas e a normalização do sistema antioxidante enzimático e não enzimático hepático em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina tratados com a fração *n*-butanol, combinados com análises farmacocinéticas *in silico*, confirmam a análise *in vitro* anterior e o efeito antioxidante deste tratamento.

Portanto, os resultados atuais demonstram que a casca dos frutos de *A. crassiflora*, uma espécie nativa do cerrado brasileiro, um *hotspot* da biodiversidade global, é uma fonte natural promissora de moléculas antioxidantes e anti-inflamatórias bioativas para aplicações clínicas, incluindo a prevenção e terapia de complicações do diabetes *mellitus* e tratamento da dor inflamatória.

7. Referências

ACTIS-GORETTA, L.; LEVEQUES, A.; REIN, M.; TEML, A.; SCHAFER, C.; HOFMANN, U.; LI, H.; SCHWAB, M.; EICHELBAUM, M.; WILLIAMSON, G. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (-)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. **Am J Clin Nutr**, 98, n. 4, p. 924-933, Oct 2013. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.065789>

AEBI, H. Catalase *in vitro*. **Methods Enzymol**, 105, p. 121-126, 1984. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(84\)05016-3](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(84)05016-3)

AHMED, N. Advanced glycation endproducts--role in pathology of diabetic complications. **Diabetes Res Clin Pract**, 67, n. 1, p. 3-21, Jan 2005. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2004.09.004>

AL-NUMAIR, K. S.; CHANDRAMOHAN, G.; VEERAMANI, C.; ALSAIF, M. A. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. **Redox Rep**, 20, n. 5, p. 198-209, Sep 2015. <https://doi.org/10.1179/1351000214Y.0000000117>

ALI KHAN, M. S.; AHMED, N.; MISBAH; ARIFUDDIN, M.; ZAKARIA, Z. A.; AL-SANEA, M. M.; KHUNDMIRI, S. U. K.; AHMED, I.; AHMED, S.; MOK, P. L. Antinociceptive mechanisms of flavonoids-rich methanolic extract from Terminalia coriacea (Roxb.) Wight & Arn. leaves. **Food Chem Toxicol**, 115, p. 523-531, May 2018. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.021>

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1994.

ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A.; RIBEIRO, J. F. **Aproveitamento alimentar de espécies nativas dos cerrados: araticum, barú, cagaita e jatobá**. 1a ed. ed. Embrapa-CPAC, Planaltina: 1987.

ARRUDA, H.; PEREIRA, G.; PASTORE, G. Brazilian Cerrado fruit araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a potential source of natural antioxidant compounds. **International Food Research Journal**, 25, p. 2005-2012, 10/01 2018.

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: A comprehensive review. **Food Res Int**, 123, p. 450-480, Sep 2019. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.05.011>

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHLAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in

Inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016, p. 5276130-5276130, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/5276130>

ARUOMA, O. I. Free radicals, antioxidants and international nutrition. **Asia Pac J Clin Nutr**, 8, n. 1, p. 53-63, Mar 1999. <https://doi.org/10.1046/j.1440-6047.1999.00036.x>

BAHADORAN, Z.; MIRMIRAN, P.; AZIZI, F. Dietary polyphenols as potential nutraceuticals in management of diabetes: a review. **J Diabetes Metab Disord**, 12, n. 1, p. 43, 2013. <https://doi.org/10.1186/2251-6581-12-43>

BAILÃO, E. F. L. C.; DEVILLA, I. A.; DA CONCEIÇÃO, E. C.; BORGES, L. L. Bioactive Compounds Found in Brazilian Cerrado Fruits. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, n. 10, p. 23760-23783, 2015. <https://doi.org/10.3390/ijms161023760>

BANDEIRA SDE, M.; GUEDES GDA, S.; DA FONSECA, L. J.; PIRES, A. S.; GELAIN, D. P.; MOREIRA, J. C.; RABELO, L. A.; VASCONCELOS, S. M.; GOULART, M. O. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. **Oxid Med Cell Longev**, 2012, p. 819310, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/819310>

BAYNES, J. W.; THORPE, S. R. Role of oxidative stress in diabetic complications: a new perspective on an old paradigm. **Diabetes**, 48, n. 1, p. 1-9, Jan 1999. <https://doi.org/10.2337/diabetes.48.1.1>

BEDEKAR, A.; SHAH, K.; KOFFAS, M. Natural products for type II diabetes treatment. **Adv Appl Microbiol**, 71, p. 21-73, 2010. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(10\)71002-9](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(10)71002-9)

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse

paw. **Brain Res.**, 924, n. 2, p. 219-228, Jan 11 2002.
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(01\)03240-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(01)03240-1)

BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. **Anal Biochem**, 239, n. 1, p. 70-76, Jul 15 1996. <https://doi.org/10.1006/abio.1996.0292>

BERG, J. M.; STRYER, L.; TYMOCZKO, J. L. **Bioquímica**. 7a ed. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan: 2014. 1162 p. p.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Anal Biochem**, 72, p. 248-254, May 7 1976. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3)

BRENNAN-OLSEN, S. L.; COOK, S.; LEECH, M. T.; BOWE, S. J.; KOWAL, P.; NAIDOO, N.; ACKERMAN, I. N.; PAGE, R. S.; HOSKING, S. M.; PASCO, J. A.; MOHEBBI, M. Prevalence of arthritis according to age, sex and socioeconomic status in six low and middle income countries: analysis of data from the World Health Organization study on global AGEing and adult health (SAGE) Wave 1. **BMC musculoskeletal disorders**, 18, n. 1, p. 271-271, 2017.
<https://doi.org/10.1186/s12891-017-1624-z>

BRIONES, E. R.; MAO, S. J.; PALUMBO, P. J.; O'FALLON, W. M.; CHENOWETH, W.; KOTTKE, B. A. Analysis of plasma lipids and apolipoproteins in insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetics. **Metabolism**, 33, n. 1, p. 42-49, Jan 1984. [https://doi.org/10.1016/0026-0495\(84\)90160-4](https://doi.org/10.1016/0026-0495(84)90160-4)

BROWNLEE, M.; CERAMI, A.; VLASSARA, H. Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. **N Engl J Med**, 318, n. 20, p. 1315-1321, May 19 1988.
<https://doi.org/10.1056/NEJM198805193182007>

BUDOVSKY, A.; YARMOLINSKY, L.; BEN-SHABAT, S. Effect of medicinal plants on wound healing. **Wound Repair Regen**, 23, n. 2, p. 171-183, Mar-Apr 2015. <https://doi.org/10.1111/wrr.12274>

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology**, 25, n. 3, p. 287-299, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2010.10.016>

CAI, G. H.; HUANG, J.; ZHAO, Y.; CHEN, J.; WU, H. H.; DONG, Y. L.; SMITH, H. S.; LI, Y. Q.; WANG, W.; WU, S. X. Antioxidant therapy for pain relief in patients with chronic pancreatitis: systematic review and meta-analysis. **Pain Physician**, 16, n. 6, p. 521-532, Nov-Dec 2013.

CALIXTO, J. B.; KASSUYA, C. A.; ANDRE, E.; FERREIRA, J. Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. **Pharmacol Ther**, 106, n. 2, p. 179-208, May 2005. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.008>

CARAMORI, S. S.; LIMA, C. S.; FERNANDES, K. F. Biochemical characterization of selected plant species from brazilian savannas. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, 47, n. 2, p. 253-259, 2004. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132004000200013>

CASPANI, O.; ZURBORG, S.; LABUZ, D.; HEPPENSTALL, P. A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. **PLoS one**, 4, n. 10, p. e7383-e7383, 2009. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007383>

CAVALCANTI, M. F. Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of the Hydroalcoholic Fraction from Leaves of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae) in Rodents. **Ortho & Rheum**, 8, n. 2, p. 555733, 2017. <https://doi.org/10.19080/OROAJ.2017.08.555733>

CHANG, C. C.; CHANG, C. Y.; HUANG, J. P.; HUNG, L. M. "Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats". ***Chin J Physiol***, 55, n. 3, p. 192-201, Jun 30 2012. <https://doi.org/10.4077/CJP.2012.BAA012>

CHANG, W. L.; CHUNG, C. H.; WU, Y. C.; SU, M. J. The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. ***Nitric Oxide***, 11, n. 4, p. 307-315, Dec 2004. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.10.004>

CHAPLAN, S. R.; BACH, F. W.; POGREL, J. W.; CHUNG, J. M.; YAKSH, T. L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. ***J Neurosci Methods***, 53, n. 1, p. 55-63, Jul 1994. [https://doi.org/10.1016/0165-0270\(94\)90144-9](https://doi.org/10.1016/0165-0270(94)90144-9)

CODERRE, T. J. The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. ***Mol Neurobiol***, 7, n. 3-4, p. 229-246, Fall-Winter 1993. <https://doi.org/10.1007/BF02769177>

CODERRE, T. J.; WALL, P. D. Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. ***Pain***, 28, n. 3, p. 379-393, Mar 1987. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90072-8](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90072-8)

CORY, H.; PASSARELLI, S.; SZETO, J.; TAMEZ, M.; MATTEI, J. The Role of Polyphenols in Human Health and Food Systems: A Mini-Review. ***Frontiers in nutrition***, 5, p. 87-87, 2018. <https://doi.org/10.3389/fnut.2018.00087>

COSKUN, O.; KANTER, M.; KORKMAZ, A.; OTER, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. ***Pharmacol Res***, 51, n. 2, p. 117-123, Feb 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.06.002>

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural products: secondary metabolites.** In: **Biochemistry and Molecular Biology of Plants.** Rockville: American Society of Plant Physiologists: 2000.

CUMAOĞLU, A.; CEVIK, Ç.; RACKOVA, L.; ARI, N.; KARASU, Ç. Effects of antioxidant stobadine on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozotocin-diabetic rats: Role of oxidative/nitrosative stress. **BioFactors**, 30, n. 3, p. 171-178, 2007. <https://doi.org/10.1002/biof.5520300304>

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A., Jr.; SILVA, J. S.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 102, n. 5, p. 1755-1760, Feb 1 2005. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>

DA COSTA OLIVEIRA, C.; DE MATOS, N. A.; DE CARVALHO VELOSO, C.; LAGE, G. A.; PIMENTA, L. P. S.; DUARTE, I. D. G.; ROMERO, T. R. L.; KLEIN, A.; DE CASTRO PEREZ, A. Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona crassiflora* Mart. in mice. **Inflammopharmacology**, Jan 25 2018. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0426-0>

DA SILVA, K. A.; PASZCUK, A. F.; PASSOS, G. F.; SILVA, E. S.; BENTO, A. F.; MEOTTI, F. C.; CALIXTO, J. B. Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. **Pain**, 152, n. 8, p. 1872-1887, Aug 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.04.005>

DE MESQUITA, M. L.; DE PAULA, J. E.; PESSOA, C.; DE MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **J Ethnopharmacol**, 123, n. 3, p. 439-445, Jun 25 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.03.018>

DE MOURA, F. B. R.; JUSTINO, A. B.; FERREIRA, B. A.; ESPINDOLA, F. S.; ARAUJO, F. A.; TOMIOSSO, T. C. Pro-Fibrogenic and Anti-Inflammatory Potential of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* in Skin Repair. **Planta Med**, 85, n. 7, p. 570-577, May 2019. <https://doi.org/10.1055/a-0733-7151>

DE OLIVEIRA, D. R.; ZAMBERLAM, C. R.; RÊGO, G. M.; CAVALHEIRO, A.; CERUTTI, J. M.; CERUTTI, S. M. Effects of a Flavonoid-Rich Fraction on the Acquisition and Extinction of Fear Memory: Pharmacological and Molecular Approaches. **Frontiers in behavioral neuroscience**, 9, p. 345-345, 2016. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00345>

DE OMENA, M. C.; NAVARRO, D. M.; DE PAULA, J. E.; LUNA, J. S.; FERREIRA DE LIMA, M. R.; SANT'ANA, A. E. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. **Bioresour Technol**, 98, n. 13, p. 2549-2556, Sep 2007. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2006.09.040>

DE PRA, S. D.; FERRO, P. R.; MILIOLI, A. M.; RIGO, F. K.; CHIPINDO, O. J.; CAMPONOGARA, C.; CASOTI, R.; MANFRON, M. P.; DE OLIVEIRA, S. M.; FERREIRA, J.; TREVISAN, G. Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. **J Ethnopharmacol**, 195, p. 283-297, Jan 4 2017. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.032>

DEAN, R. T.; FU, S.; STOCKER, R.; DAVIES, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. **Biochemical Journal**, 324, n. Pt 1, p. 1-18, 1997. <https://doi.org/10.1042/bj3240001>

DEY, A.; LAKSHMANAN, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. **Food Funct**, 4, n. 8, p. 1148-1184, Aug 2013. <https://doi.org/10.1039/c3fo30317a>

DEY, A.; SWAMINATHAN, K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. **Life Sci**, 87, n. 7-8, p. 197-214, Aug 14 2010. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2010.06.007>

DIAS, A. S.; PORAWSKI, M.; ALONSO, M.; MARRONI, N.; COLLADO, P. S.; GONZALEZ-GALLEGOS, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF-kappaB activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. **J Nutr**, 135, n. 10, p. 2299-2304, Oct 2005. <https://doi.org/10.1093/jn/135.10.2299>

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, 2, n. 2, p. 303-336, 2012. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

DIAZ-FLORES, M.; IBANEZ-HERNANDEZ, M. A.; GALVAN, R. E.; GUTIERREZ, M.; DURAN-REYES, G.; MEDINA-NAVARRO, R.; PASCOE-LIRA, D.; ORTEGA-CAMARILLO, C.; VILAR-ROJAS, C.; CRUZ, M.; BAIZA-GUTMAN, L. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. **Life Sci**, 78, n. 22, p. 2601-2607, Apr 25 2006. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2005.10.022>

DINIZ VILELA, D.; GOMES PEIXOTO, L.; TEIXEIRA, R. R.; BELELE BAPTISTA, N.; CARVALHO CAIXETA, D.; VIEIRA DE SOUZA, A.; MACHADO, H. L.; PEREIRA, M. N.; SABINO-SILVA, R.; ESPINDOLA, F. S. The Role of Metformin in Controlling Oxidative Stress in Muscle of Diabetic Rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, 2016, p. 6978625, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/6978625>

DOS SANTOS, A. F.; SANT'ANA, A. E. Molluscicidal properties of some species of Annona. **Phytomedicine**, 8, n. 2, p. 115-120, Mar 2001. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00008>

DRAGANO, N. R.; DE VENANCIO, V. P.; PAULA, F. B.; DELLA LUCIA, F.; FONSECA, M. J.; AZEVEDO, L. Influence of Marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. **Plant Foods Hum Nutr**, 65, n. 4, p. 319-325, Dec 2010. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0191-3>

DUARTE, J.; FRANCISCO, V.; PEREZ-VIZCAINO, F. Modulation of nitric oxide by flavonoids. **Food Funct**, 5, n. 8, p. 1653-1668, Aug 2014. <https://doi.org/10.1039/C4FO00144C>

ELOSTA, A.; GHOUSS, T.; AHMED, N. Natural products as anti-glycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications. **Curr Diabetes Rev**, 8, n. 2, p. 92-108, Mar 2012. <https://doi.org/10.2174/157339912799424528>

EMERY, P. Treatment of rheumatoid arthritis. **BMJ (Clinical research ed.)**, 332, n. 7534, p. 152-155, 2006. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7534.152>

FILHO, A. W.; FILHO, V. C.; OLINGER, L.; DE SOUZA, M. M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Arch Pharm Res**, 31, n. 6, p. 713-721, Jun 2008. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1217-2>

FUBINI, B.; HUBBARD, A. Reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (RNS) generation by silica in inflammation and fibrosis. **Free Radic Biol Med**, 34, n. 12, p. 1507-1516, Jun 15 2003. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(03\)00149-7](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(03)00149-7)

GELLER, D. A.; BILLIAR, T. R. Molecular biology of nitric oxide synthases. **Cancer Metastasis Rev**, 17, n. 1, p. 7-23, Mar 1998. <https://doi.org/10.1023/A:1005940202801>

GIACCO, F.; BROWNLEE, M. Oxidative stress and diabetic complications. **Circulation research**, 107, n. 9, p. 1058-1070, 2010. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.110.223545>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, 30, n. 2, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GRAF, B. A.; MILBURY, P. E.; BLUMBERG, J. B. Flavonols, flavones, flavanones, and human health: epidemiological evidence. **J Med Food**, 8, n. 3, p. 281-290, Fall 2005. <https://doi.org/10.1089/jmf.2005.8.281>

GRANGER, D. L.; TAINTOR, R. R.; BOOCKVAR, K. S.; HIBBS, J. B., Jr. Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. **Methods Enzymol**, 268, p. 142-151, 1996. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(96\)68016-1](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)68016-1)

GRAY, A. M.; FLATT, P. R. Insulin-releasing and insulin-like activity of the traditional anti-diabetic plant *Coriandrum sativum* (coriander). **Br J Nutr**, 81, n. 3, p. 203-209, Mar 1999. <https://doi.org/10.1017/S0007114599000392>

GU, L.; HOUSE, S. E.; WU, X.; OU, B.; PRIOR, R. L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. **J Agric Food Chem**, 54, n. 11, p. 4057-4061, May 31 2006. <https://doi.org/10.1021/jf060360r>

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, 56, n. 9, p. 683-687, Sep 2001. [https://doi.org/10.1016/S0014-827X\(01\)01111-9](https://doi.org/10.1016/S0014-827X(01)01111-9)

GUO, Q.; WANG, Y.; XU, D.; NOSSENT, J.; PAVLOS, N. J.; XU, J. Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. **Bone research**, 6, p. 15-15, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0016-9>

HÄMÄLÄINEN, M.; NIEMINEN, R.; VUORELA, P.; HEINONEN, M.; MOILANEN, E. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators of inflammation**, 2007, p. 45673-45673, 2007. <https://doi.org/10.1155/2007/45673>

HOLMGREN, P. R.; BROWN, A. C. Serum cholesterol levels of nondiabetic and streptozotocin-diabetic rats fed a high cholesterol diet. **Artery**, 20, n. 6, p. 337-345, 1993.

HORIE, S.; ISHII, H.; SUGA, T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. **J Biochem**, 90, n. 6, p. 1691-1696, Dec 1981. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133645>

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **J Agric Food Chem**, 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar 23 2005. <https://doi.org/10.1021/jf030723c>

HUGHES, S. D.; KETHEESAN, N.; HALEAGRAHARA, N. The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 57, n. 17, p. 3601-3613, 2017. <https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1246413>

INOUE, M.; OHTAKE, T.; MOTOMURA, W.; TAKAHASHI, N.; HOSOKI, Y.; MIYOSHI, S.; SUZUKI, Y.; SAITO, H.; KOHGO, Y.; OKUMURA, T. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 336, n. 1, p. 215-222, 10/14/2005. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.08.070>

JANG, Y. Y.; SONG, J. H.; SHIN, Y. K.; HAN, E. S.; LEE, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. **Pharmacol Res**, 42, n. 4, p. 361-371, Oct 2000.
<https://doi.org/10.1006/phrs.2000.0705>

JEANDROZ, S.; LAMOTTE, O. Editorial: Plant Responses to Biotic and Abiotic Stresses: Lessons from Cell Signaling. **Frontiers in plant science**, 8, p. 1772-1772, 2017. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.01772>

JHUN, J. Y.; MOON, S.-J.; YOON, B. Y.; BYUN, J. K.; KIM, E. K.; YANG, E. J.; JU, J. H.; HONG, Y. S.; MIN, J. K.; PARK, S. H.; KIM, H. Y.; CHO, M.-L. Grape seed proanthocyanidin extract-mediated regulation of STAT3 proteins contributes to Treg differentiation and attenuates inflammation in a murine model of obesity-associated arthritis. **PLoS one**, 8, n. 11, p. e78843-e78843, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078843>

JIANG, C. P.; HE, X.; YANG, X. L.; ZHANG, S. L.; LI, H.; SONG, Z. J.; ZHANG, C. F.; YANG, Z. L.; LI, P.; WANG, C. Z.; YUAN, C. S. Anti-rheumatoid arthritic activity of flavonoids from Daphne genkwa. **Phytomedicine**, 21, n. 6, p. 830-837, May 15 2014. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.009>

JIANG, R.; HODGSON, J. M.; MAS, E.; CROFT, K. D.; WARD, N. C. Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. **J Nutr Biochem**, 27, p. 53-60, Jan 2016.
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.08.017>

JOHANSEN, J. S.; HARRIS, A. K.; RYCHLY, D. J.; ERGUL, A. Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: Linking basic science to clinical practice. **Cardiovascular Diabetology**, 4, p. 5-5, 2005. <https://doi.org/10.1186/1475-2840-4-5>

JUSTINO, A. B.; BARBOSA, M. F.; NEVES, T. V.; SILVA, H. C. G.; BRUM, E. d. S.; FIALHO, M. F. P.; COUTO, A. C.; SARAIVA, A. L.; AVILA, V. d. M. R.; OLIVEIRA, S. M.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S.; SILVA, C. R. Stephalagine, an aporphine alkaloid from *Annona crassiflora* fruit peel, induces antinociceptive effects by TRPA1 and TRPV1 channels modulation in mice. **Bioorganic Chemistry**, 96, p. 103562, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103562>

JUSTINO, A. B.; DE MOURA, F. R. B.; FRANCO, R. R.; ESPINDOLA, F. S. α -Glucosidase and non-enzymatic glycation inhibitory potential of *Eugenia dysenterica* fruit pulp extracts. **Food Bioscience**, 35, p. 100573, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100573>

JUSTINO, A. B.; FRANCO, R. R.; SILVA, H. C. G.; SARAIVA, A. L.; SOUSA, R. M. F.; ESPINDOLA, F. S. B procyanidins of *Annona crassiflora* fruit peel inhibited glycation, lipid peroxidation and protein-bound carbonyls, with protective effects on glycated catalase. **Scientific reports**, 9, n. 1, p. 19183-19183, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-55779-3>

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R.; MARTINS, M. M.; SILVA, N. M. D.; ESPINDOLA, F. S. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against alpha-amylase, alpha-glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomed Pharmacother**, 100, p. 83-92, Apr 2018. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.01.172>

JUSTINO, A. B.; PEREIRA, M. N.; VILELA, D. D.; PEIXOTO, L. G.; MARTINS, M. M.; TEIXEIRA, R. R.; MIRANDA, N. C.; DA SILVA, N. M.; DE SOUSA, R. M. F.; DE OLIVEIRA, A.; ESPINDOLA, F. S. Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. **Bioorganic Chemistry**, 69, p. 167-182, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>

KANG, G. G.; FRANCIS, N.; HILL, R.; WATERS, D.; BLANCHARD, C.; SANTHAKUMAR, A. B. Dietary Polyphenols and Gene Expression in Molecular Pathways Associated with Type 2 Diabetes Mellitus: A Review. **International journal of molecular sciences**, 21, n. 1, p. 140, 2019.
<https://doi.org/10.3390/ijms21010140>

KHAN, M.; LIU, H.; WANG, J.; SUN, B. Inhibitory effect of phenolic compounds and plant extracts on the formation of advance glycation end products: A comprehensive review. **Food Research International**, 130, p. 108933, 2020.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108933>

KHANNA, S.; JAISWAL, K. S.; GUPTA, B. Managing Rheumatoid Arthritis with Dietary Interventions. **Frontiers in nutrition**, 4, p. 52-52, 2017.
<https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00052>

KIM, H. K.; CHEON, B. S.; KIM, Y. H.; KIM, S. Y.; KIM, H. P. Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. **Biochem Pharmacol**, 58, n. 5, p. 759-765, Sep 01 1999. [https://doi.org/10.1016/S0006-2952\(99\)00160-4](https://doi.org/10.1016/S0006-2952(99)00160-4)

KING, N. B.; FRASER, V. Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. **PLoS medicine**, 10, n. 4, p. e1001411-e1001411, 2013.
<https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001411>

KOWLURU, R. A.; KOPPOLU, P.; CHAKRABARTI, S.; CHEN, S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. **Free Radic Res**, 37, n. 11, p. 1169-1180, Nov 2003.
<https://doi.org/10.1080/10715760310001604189>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **Scientific World Journal**, 2013, p. 162750, 2013.
<https://doi.org/10.1155/2013/162750>

LARMONIER, N.; GHIRINGHELLI, F.; LARMONIER, C. B.; MOUTET, M.; FROMENTIN, A.; BAULOT, E.; SOLARY, E.; BONNOTTE, B.; MARTIN, F. Freshly isolated bone marrow cells induce death of various carcinoma cell lines. **International journal of cancer**, 107, n. 5, p. 747-756, 2003. <https://doi.org/10.1002/ijc.11463>

LAU, Y. S.; LING, W. C.; MURUGAN, D.; MUSTAFA, M. R. Boldine Ameliorates Vascular Oxidative Stress and Endothelial Dysfunction: Therapeutic Implication for Hypertension and Diabetes. **J Cardiovasc Pharmacol**, 65, n. 6, p. 522-531, Jun 2015. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000185>

LEE, Y. A.; KIM, Y. J.; CHO, E. J.; YOKOZAWA, T. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. **J Agric Food Chem**, 55, n. 23, p. 9395-9400, Nov 14 2007. <https://doi.org/10.1021/jf071523u>

LEE, Y. C. Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. **Current rheumatology reports**, 15, n. 1, p. 300-300, 2013. <https://doi.org/10.1007/s11926-012-0300-4>

LEONG, S.; LIU, H.; YEO, J. Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. **Brain Res**, 855, n. 1, p. 107-115, Feb 7 2000. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(99\)02316-1](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(99)02316-1)

LEVINE, R. L.; GARLAND, D.; OLIVER, C. N.; AMICI, A.; CLIMENT, I.; LENZ, A. G.; AHN, B. W.; SHALTIEL, S.; STADTMAN, E. R. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol**, 186, p. 464-478, 1990. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)86141-H](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)86141-H)

LEYVA-LOPEZ, N.; GUTIERREZ-GRIJALVA, E. P.; AMBRIZ-PEREZ, D. L.; HEREDIA, J. B. Flavonoids as Cytokine Modulators: A Possible Therapy for

Inflammation-Related Diseases. **Int J Mol Sci**, 17, n. 6, Jun 9 2016.
<https://doi.org/10.3390/ijms17060921>

LI, S.; TAN, H.-Y.; WANG, N.; ZHANG, Z.-J.; LAO, L.; WONG, C.-W.; FENG, Y. The Role of Oxidative Stress and Antioxidants in Liver Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, 16, n. 11, p. 26087-26124, 2015.
<https://doi.org/10.3390/ijms161125942>

LIMTRAKUL, P.; YODKEEREE, S.; PITCHAKARN, P.; PUNFA, W. Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF-kappaB pathways in Raw 264.7 macrophages. **Nutr Res Pract**, 10, n. 3, p. 251-258, Jun 2016. <https://doi.org/10.4162/nrp.2016.10.3.251>

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, 137, n. 3, p. 473-477, Jul 31 2008.
<https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>

LOPES, L. d. S.; MARQUES, R. B.; FERNANDES, H. B.; PEREIRA, S. d. S.; AYRES, M. C. C.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C. Mechanisms of the antinociceptive action of (-) epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of Combretum leprosum Mart & Eic in rodents. **Journal of biomedical science**, 19, n. 1, p. 68-68, 2012. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-19-68>

LU, J. M.; LIN, P. H.; YAO, Q.; CHEN, C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **J Cell Mol Med**, 14, n. 4, p. 840-860, Apr 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>

MACHADO, A. R.; FERREIRA, S. R.; DA SILVA MEDEIROS, F.; FUJIWARA, R. T.; DE SOUZA FILHO, J. D.; PIMENTA, L. P. Nematicidal activity of Annona crassiflora leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. **Parasit Vectors**, 8, p. 113, 2015. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0708-6>

MADAR, Z.; KALET-LITMAN, S.; STARK, A. H. Inducible Nitric Oxide Synthase Activity and Expression in Liver and Hepatocytes of Diabetic Rats. **Pharmacology**, 73, n. 2, p. 106-112, 2005. <https://doi.org/10.1159/000081952>

MARKLUND, A.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the auto-oxidation of pyrogallol and convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem**, 47, 1974. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1974.tb03714.x>

MAROON, J. C.; BOST, J. W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surgical neurology international**, 1, p. 80-80, 2010. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.73804>

MATSUNAMI, T.; SATO, Y.; SATO, T.; ARIGA, S.; SHIMOMURA, T.; YUKAWA, M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. **Int J Clin Exp Pathol**, 3, n. 2, p. 177-188, Nov 30 2009.

MCDougall, J. J. Arthritis and Pain. Neurogenic origin of joint pain. **Arthritis Research & Therapy**, 8, n. 6, p. 220, November 10 2006. <https://doi.org/10.1186/ar2069>

MEDINA, J.; MORENO-OTERO, R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. **Drugs**, 65, n. 17, p. 2445-2461, 2005. <https://doi.org/10.2165/00003495-200565170-00003>

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G. F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**, 71, n. 2, p. 327-335, Mar 1996. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00442-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00442-4)

MIDDLETON, E., Jr. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Adv Exp Med Biol**, 439, p. 175-182, 1998. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-5335-9_13

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Prog Neurobiol**, 57, n. 1, p. 1-164, Jan 1999. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(98\)00048-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(98)00048-3)

MITTERMEIER, R. A.; DA FONSECA, G. A. B.; RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. **Megadiversidade**, 1, n. 1, p. 14-21, 2005.

MORAES, I. B.; MANZAN-MARTINS, C.; DE GOUVEIA, N. M.; CALÁBRIA, L. K.; HIRAKI, K. R. N.; MORAES, A. d. S.; ESPINDOLA, F. S. Polypliody Analysis and Attenuation of Oxidative Stress in Hepatic Tissue of STZ-Induced Diabetic Rats Treated with an Aqueous Extract of Vochysia rufa. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015, p. 8, 2015. <https://doi.org/10.1155/2015/316017>

NAGY, G.; KONCZ, A.; TELARICO, T.; FERNANDEZ, D.; ERSEK, B.; BUZÁS, E.; PERL, A. Central role of nitric oxide in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. **Arthritis research & therapy**, 12, n. 3, p. 210-210, 2010. <https://doi.org/10.1186/ar3045>

OLIVEIRA, S. M.; SILVA, C. R.; WENTZ, A. P.; PAIM, G. R.; CORREA, M. S.; BONACORSO, H. G.; PRUDENTE, A. S.; OTUKI, M. F.; FERREIRA, J. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, 124, p. 396-404, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.005>

OLSZANECKI, R.; GEBSKA, A.; KOZLOVSKI, V. I.; GRYGLEWSKI, R. J. Flavonoids and nitric oxide synthase. **J Physiol Pharmacol**, 53, n. 4 Pt 1, p. 571-584, Dec 2002.

OLTHOF, M. R.; HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Chlorogenic acid and caffeic acid are absorbed in humans. **J Nutr**, 131, n. 1, p. 66-71, Jan 2001. <https://doi.org/10.1093/jn/131.1.66>

ONG, C. K.; LIRK, P.; TAN, C. H.; SEYMOUR, R. A. An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Clin Med Res**, 5, n. 1, p. 19-34, Mar 2007. <https://doi.org/10.3121/cmr.2007.698>

OWEN, S. C.; DOAK, A. K.; GANESH, A. N.; NEDYALKOVA, L.; MCLAUGHLIN, C. K.; SHOICHER, B. K.; SHOICHER, M. S. Colloidal drug formulations can explain "bell-shaped" concentration-response curves. **ACS chemical biology**, 9, n. 3, p. 777-784, 2014. <https://doi.org/10.1021/cb4007584>

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiol Rev**, 87, n. 1, p. 315-424, Jan 2007. <https://doi.org/10.1152/physrev.00029.2006>

PACHER, P.; OBROSOVA, I. G.; MABLEY, J. G.; SZABO, C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutical strategies. **Curr Med Chem**, 12, n. 3, p. 267-275, 2005. <https://doi.org/10.2174/0929867053363207>

PALHARES, R. M.; GONÇALVES DRUMMOND, M.; DOS SANTOS ALVES FIGUEIREDO BRASIL, B.; PEREIRA COSENZA, G.; DAS GRAÇAS LINS BRANDÃO, M.; OLIVEIRA, G. Medicinal plants recommended by the world health organization: DNA barcode identification associated with chemical analyses guarantees their quality. **PLoS one**, 10, n. 5, p. e0127866-e0127866, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0127866>

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant polyphenols as dietary antioxidants in human health and disease. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2, n. 5, p. 270-278, Nov-Dec 2009. <https://doi.org/10.4161/oxim.2.5.9498>

PATEL, D. K.; PRASAD, S. K.; KUMAR, R.; HEMALATHA, S. An overview on antidiabetic medicinal plants having insulin mimetic property. **Asian Pac J Trop Biomed**, 2, n. 4, p. 320-330, Apr 2012. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(12\)60032-X](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(12)60032-X)

PEREIRA, M. N.; JUSTINO, A. B.; MARTINS, M. M.; PEIXOTO, L. G.; VILELA, D. D.; SANTOS, P. S.; TEIXEIRA, T. L.; DA SILVA, C. V.; GOULART, L. R.; PIVATTO, M.; ESPINDOLA, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. **Industrial Crops and Products**, 97, p. 324-329, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>

PICKUP, J. C. Inflammation and activated innate immunity in the pathogenesis of type 2 diabetes. **Diabetes Care**, 27, n. 3, p. 813-823, Mar 2004. <https://doi.org/10.2337/diacare.27.3.813>

PIMENTA, L. P.; GARCIA, G. M.; GONCALVES, S. G.; DIONISIO, B. L.; BRAGA, E. M.; MOSQUEIRA, V. C. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. **Nat Prod Res**, 28, n. 16, p. 1254-1259, 2014. <https://doi.org/10.1080/14786419.2014.900496>

PIMENTA, L. P. S.; MENDONÇA, D. D.; PRETTI, D. L.; CRUZ, B. L. D.; LEITE, E. A.; OLIVEIRA, M. C. D. EVALUATION OF IN-VIVO ANTITUMOR ACTIVITY OF ANNONA CRASSIFLORA WOOD EXTRACT. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, 3, n. 3, 2011.

PIRES, D. E.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures. **J Med Chem**, 58, n. 9, p. 4066-4072, May 14 2015. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

PIRES, D. E. V.; BLUNDELL, T. L.; ASCHER, D. B. pkCSM: Predicting Small-Molecule Pharmacokinetic and Toxicity Properties Using Graph-Based Signatures.

Journal of Medicinal Chemistry, 58, n. 9, p. 4066-4072, 2015.
<https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b00104>

PRABHAKAR, S. S. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. **Semin Nephrol**, 24, n. 4, p. 333-344, Jul 2004. <https://doi.org/10.1016/j.semephrol.2004.04.005>

QAZI, A. K.; SIDDIQUI, J. A.; JAHAN, R.; CHAUDHARY, S.; WALKER, L. A.; SAYED, Z.; JONES, D. T.; BATRA, S. K.; MACHA, M. A. Emerging therapeutic potential of graviola and its constituents in cancers. **Carcinogenesis**, 39, n. 4, p. 522-533, Apr 5 2018. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgy024>

QUINTANS, J. S.; ANTONIOLLI, A. R.; ALMEIDA, J. R.; SANTANA-FILHO, V. J.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Natural products evaluated in neuropathic pain models - a systematic review. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, 114, n. 6, p. 442-450, Jun 2014. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12178>

RAKEL, B.; VANCE, C.; ZIMMERMAN, M. B.; PETSAS-BLODGETT, N.; AMENDOLA, A.; SLUKA, K. A. Mechanical hyperalgesia and reduced quality of life occur in people with mild knee osteoarthritis pain. **Clin J Pain**, 31, n. 4, p. 315-322, Apr 2015. <https://doi.org/10.1097/AJP.0000000000000116>

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. **O bioma cerrado. In: Ambiente e Flora.** Embrapa-CPAC, Planaltina: 1998.

RIBEIRO, R. A.; RODRIGUES, F. M. Genética da conservação em espécies vegetais do cerrado. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 5, p. 253-260, 2006.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, 2, n. 4, p. 152-159, 1997. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(97\)01018-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(97)01018-2)

RIOS, J. L.; FRANCINI, F.; SCHINELLA, G. R. Natural Products for the Treatment of Type 2 Diabetes Mellitus. **Planta Med**, 81, n. 12-13, p. 975-994, Aug 2015. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1546131>

ROCHA, R. S.; KASSUYA, C. A.; FORMAGIO, A. S.; MAURO MDE, O.; ANDRADE-SILVA, M.; MONREAL, A. C.; CUNHA-LAURA, A. L.; VIEIRA MDO, C.; OLIVEIRA, R. J. Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassiflora* methanolic extract. **Pharm Biol**, 54, n. 1, p. 35-47, 2016. <https://doi.org/10.3109/13880209.2015.1014567>

ROESLER, R. Effect of extracts from araticum (*Annona crassiflora*) on CCl₄-induced liver damage in rats. **Food Science and Technology**, 31, p. 93-100, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612011000100012>

ROESLER, R.; CATHARINO, R. R.; MALTA, L. G.; EBERLIN, M. N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, 104, p. 1048-1054, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.01.017>

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; PASTORE, G. Evaluation of the Antioxidant Properties of the Brazilian Cerrado Fruit *Annona crassiflora* (Araticum). **Journal of Food Science**, 71, n. 2, p. C102-C107, 2006. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2006.tb08882.x>

ROLO, A. P.; PALMEIRA, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. **Toxicol Appl Pharmacol**, 212, n. 2, p. 167-178, Apr 15 2006. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2006.01.003>

ROSALKI, S. B. Gamma-glutamyl transpeptidase. **Adv Clin Chem**, 17, p. 53-107, 1975. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(08\)60248-6](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(08)60248-6)

ROSSATO, M. F.; HOFFMEISTER, C.; TREVISAN, G.; BEZERRA, F.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, J.; SILVA, C. R. Monosodium urate crystal interleukin-1beta release is dependent on Toll-like receptor 4 and transient receptor potential V1 activation. **Rheumatology (Oxford)**, Jul 11 2019. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kez259>

SAMUEL, V. T.; SHULMAN, G. I. Mechanisms for insulin resistance: common threads and missing links. **Cell**, 148, n. 5, p. 852-871, Mar 2 2012. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.017>

SANCHEZ-VALLE, V.; CHAVEZ-TAPIA, N. C.; URIBE, M.; MENDEZ-SANCHEZ, N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. **Curr Med Chem**, 19, n. 28, p. 4850-4860, 2012. <https://doi.org/10.2174/092986712803341520>

SANTOS, L. P.; BOAVENTURA, M. A.; DE OLIVEIRA, A. B. Crassiflorina, uma acetogenina tetra-hidrofuranica citotóxica de *Annona crassiflora* (araticum). **Química Nova**, 17, n. 5, p. 387-391, 1994.

SCALBERT, A.; MORAND, C.; MANACH, C.; REMESY, C. Absorption and metabolism of polyphenols in the gut and impact on health. **Biomed Pharmacother**, 56, n. 6, p. 276-282, Aug 2002. [https://doi.org/10.1016/S0753-3322\(02\)00205-6](https://doi.org/10.1016/S0753-3322(02)00205-6)

SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C.; MORAND, C.; JIMÉNEZ, L.; MANACH, C. Polyphenols: food sources and bioavailability. **The American Journal of Clinical Nutrition**, 79, n. 5, p. 727-747, 2004. <https://doi.org/10.1093/ajcn/79.5.727>

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proc Nutr Soc**, 69, n. 3, p. 273-278, Aug 2010. <https://doi.org/10.1017/S002966511000162X>

SILVA, C. R.; OLIVEIRA, S. M.; HOFFMEISTER, C.; FUNCK, V.; GUERRA, G. P.; TREVISAN, G.; TONELLO, R.; ROSSATO, M. F.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; OLIVEIRA, M. S.; MCDOUGALL, J. J.; FERREIRA, J. The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. **Ann Rheum Dis**, 75, n. 1, p. 260-268, Jan 2016. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2014-205739>

SILVA, J. J.; CERDEIRA, C. D.; CHAVASCO, J. M.; CINTRA, A. B.; SILVA, C. B.; MENDONCA, A. N.; ISHIKAWA, T.; BORIOLLO, M. F.; CHAVASCO, J. K. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, 56, n. 4, p. 333-340, Jul-Aug 2014. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652014000400011>

SILVA, V. A. O.; ALVES, A. L. V.; ROSA, M. N.; SILVA, L. R. V.; MELENDEZ, M. E.; CURY, F. P.; GOMES, I. N. F.; TANSINI, A.; LONGATO, G. B.; MARTINHO, O.; OLIVEIRA, B. G.; PINTO, F. E.; ROMÃO, W.; RIBEIRO, R. I. M. A.; REIS, R. M. Hexane partition from *Annona crassiflora* Mart. promotes cytotoxicity and apoptosis on human cervical cancer cell lines. **Investigational New Drugs**, 37, n. 4, p. 602-615, 2019. <https://doi.org/10.1007/s10637-018-0657-y>

SINGH, A. K.; VINAYAK, M. Curcumin attenuates CFA induced thermal hyperalgesia by modulation of antioxidant enzymes and down regulation of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6. **Neurochem Res**, 40, n. 3, p. 463-472, Mar 2015. <https://doi.org/10.1007/s11064-014-1489-6>

SPENCER, J. P.; SCHROETER, H.; SHENOY, B.; SRAI, S. K.; DEBNAM, E. S.; RICE-EVANS, C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the procyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. **Biochem Biophys Res Commun**, 285, n. 3, p. 588-593, Jul 20 2001. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5211>

SPILLER, F.; OLIVEIRA FORMIGA, R.; FERNANDES DA SILVA COIMBRA, J.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q. Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain. **Nitric Oxide**, 89, p. 32-40, Aug 1 2019. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.011>

SUNDARRAJAN, S.; ARUMUGAM, M. A systems pharmacology perspective to decipher the mechanism of action of Parangichakkai chooranam, a Siddha formulation for the treatment of psoriasis. **Biomed Pharmacother**, 88, p. 74-86, Apr 2017. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2016.12.135>

TABASSUM, H.; PARVEZ, S.; REHMAN, H.; BANERJEE, B. D.; RAISUDDIN, S. Catechin as an antioxidant in liver mitochondrial toxicity: Inhibition of tamoxifen-induced protein oxidation and lipid peroxidation. **J Biochem Mol Toxicol**, 21, n. 3, p. 110-117, 2007. <https://doi.org/10.1002/jbt.20167>

TAKAHASHI, J. A.; PEREIRA, C. R.; PIMENTA, L. P.; BOAVENTURA, M. A.; SILVA, L. G. Antibacterial activity of eight Brazilian annonaceae plants. **Nat Prod Res**, 20, n. 1, p. 21-26, Jan 2006. <https://doi.org/10.1080/14786410412331280087>

TANIYAMA, Y.; GRIENDLING, K. K. Reactive oxygen species in the vasculature: molecular and cellular mechanisms. **Hypertension**, 42, n. 6, p. 1075-1081, Dec 2003. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000100443.09293.4F>

TOWBIN, H.; STAEHELIN, T.; GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. 1979. **Biotechnology**, 24, p. 145-149, 1992.

TREVISAN, G.; ROSSATO, M. F.; TONELLO, R.; HOFFMEISTER, C.; KLAFKE, J. Z.; ROSA, F.; PINHEIRO, K. V.; PINHEIRO, F. V.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; FERREIRA, J. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**, 387, n. 7, p. 679-689, Jul 2014. <https://doi.org/10.1007/s00210-014-0978-0>

VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **Journal of advanced pharmaceutical technology & research**, 3, n. 4, p. 200-201, 2012. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.104709>

VILAR, J. B.; FERREIRA, F. L.; FERRI, P. H.; GUILLO, L. A.; CHEN CHEN, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. **Braz J Biol**, 68, n. 1, p. 141-147, Feb 2008. <https://doi.org/10.1590/S1519-69842008000100020>

VINAYAGAM, R.; XU, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. **Nutr Metab (Lond)**, 12, p. 60, 2015. <https://doi.org/10.1186/s12986-015-0057-7>

VON BANCHET, G. S.; RICHTER, J.; HUCKEL, M.; ROSE, C.; BRAUER, R.; SCHAILBE, H. G. Fibroblast-like synovial cells from normal and inflamed knee joints differently affect the expression of pain-related receptors in sensory neurones: a co-culture study. **Arthritis Res Ther**, 9, n. 1, p. R6, 2007. <https://doi.org/10.1186/ar2112>

WAGNER, H.; ULRICH-MERZENICH, G. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. **Phytomedicine**, 16, n. 2-3, p. 97-110, Mar 2009. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>

WANDJI, B. A.; BOMBA, F. D. T.; NKENG-EFOUET, P. A.; PIEGANG, B. N.; KAMANYI, A.; NGUELEFACK, T. B. Anti-hyperalgesic activity of the aqueous and methanol extracts of the leaves of *Pittosporum mannii* Hook on CFA-induced persistent inflammatory pain. **Inflammopharmacology**, 26, n. 1, p. 197-205, Feb 2018. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0376-6>

WILCOX, G. Insulin and insulin resistance. **The Clinical biochemist. Reviews**, 26, n. 2, p. 19-39, 2005.

WOLF, P. L. Clinical significance of an increased or decreased serum alkaline phosphatase level. **Arch Pathol Lab Med**, 102, n. 10, p. 497-501, Oct 1978.

YAMAGATA, K. Do Coffee Polyphenols Have a Preventive Action on Metabolic Syndrome Associated Endothelial Dysfunctions? An Assessment of the Current Evidence. **Antioxidants (Basel, Switzerland)**, 7, n. 2, p. 26, 2018. <https://doi.org/10.3390/antiox7020026>

YAMAKOSHI, J.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KIKUCHI, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. **Food Chem Toxicol**, 40, n. 5, p. 599-607, May 2002. [https://doi.org/10.1016/S0278-6915\(02\)00006-6](https://doi.org/10.1016/S0278-6915(02)00006-6)

YATES, J. W.; ARUNDEL, P. A. On the volume of distribution at steady state and its relationship with two-compartmental models. **J Pharm Sci**, 97, n. 1, p. 111-122, Jan 2008. <https://doi.org/10.1002/jps.21089>

YE, H. Y.; LI, Z. Y.; ZHENG, Y.; CHEN, Y.; ZHOU, Z. H.; JIN, J. The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. **Arch Pharm Res**, 39, n. 7, p. 989-997, Jul 2016. <https://doi.org/10.1007/s12272-016-0771-3>

ZHENG, Y.; LEY, S. H.; HU, F. B. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. **Nat Rev Endocrinol**, 14, n. 2, p. 88-98, Feb 2018. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>

ZHU, F.; QIAN, C. Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1beta and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. **BMC neuroscience**, 7, p. 78-78, 2006. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-78>

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, 16, n. 2, p. 109-110, Jun 1983.
[https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4)

Anexos

Anexo 1: Autorização de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético.

 <p>Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético</p> <p>O Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq, nos termos Deliberação 246/2009, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, autoriza a instituição identificada no verso deste documento a acessar e remeter componente do Patrimônio Genético com a finalidade de pesquisa científica.</p> <p>Brasília, 02 de outubro de 2015 Marcelo Marcos Morales Diretor de Ciências Agrárias, Biológicas e da Saúde PO 513/2013</p>	<p>Processo: 010743/2015-4 Validade: 02/11/2015 a 02/11/2017 Instituição: UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA CNPJ: 256.483.870/0001-18 Pesquisador: Foued Salmen Espindola CPF: 242.039.476-34 RG: M1189277 - SSP / MG</p> <p><i>Para visualizar a versão digital da Autorização de Acesso e de Remessa de Componente do Patrimônio Genético, V.Sa. poderá utilizar a ferramenta disponibilizada pelo CNPq para esse fim na página http://servicosweb.cnpq.br/visualizador e informar o número do protocolo 9504814591790738 para recuperá-la do banco de dados do CNPq</i></p>
--	---

Anexo 2: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU-105/17).



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de uma fração rica em polifenóis da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. em camundongos", protocolo nº 105/17, sob a responsabilidade de **Cássia Regina da Silva** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião **09 de Março de 2018**.

(We certify that the project entitled "Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de uma fração rica em polifenóis da casca do fruto da *Annona crassiflora* Mart. em camundongos", protocol 105/17, under the responsibility of Cássia Regina da Silva - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of March 09th, 2018).

Vigência do Projeto	Ínicio: 05/04/18 Término: 05/04/2020
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	Camundongo isogênico
Número de animais	108
Peso / Idade	20 g / 6 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério Central da UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 26 de março de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 3: Certificado de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU-090/15).



Universidade Federal de Uberlândia

– Comissão de Ética na Utilização de Animais –



Comissão de Ética na
Utilização de Animais
CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "Plantas Medicinais, Frutos do Cerrado e Diabetes Mellitus: descoberta de inibidores de enzimas alvos, atividades antiglicação e antioxidante, efeito neuroprotetor em modelo experimental e caracterização por análise fitoquímica biomonitorada dos extratos candidatos", protocolo nº 090/15, sob a responsabilidade de **Foued Salmen Espindola** – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADO** pela COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS (CEUA) da UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA, em reunião de **13 de novembro de 2015**.

(We certify that the project entitled "Plantas Medicinais, Frutos do Cerrado e Diabetes Mellitus: descoberta de inibidores de enzimas alvos, atividades antiglicação e antioxidante, efeito neuroprotetor em modelo experimental e caracterização por análise fitoquímica biomonitorada dos extratos candidatos", protocol 090/15, under the responsibility of Foued Salmen Espindola - involving the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata, for purposes of scientific research - is in accordance with the provisions of Law nº 11.794, of October 8th, 2008, of Decree nº 6.899 of July 15th, 2009, and the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and it was approved for ETHICS COMMISSION ON ANIMAL USE (CEUA) from FEDERAL UNIVERSITY OF UBERLÂNDIA, in meeting of November 13th, 2015.

Vigência do Projeto	Ínicio: 14/12/2015 / Término: 08/07/2016
Espécie / Linhagem / Grupos Taxonômicos	- / Wistar
Número de animais	90
Peso / Idade	200-220g / 8 semanas
Sexo	Machos
Origem / Local	Biotério - UFU
Número da Autorização SISBIO	-
Atividade(s)	-

Uberlândia, 02 de dezembro de 2015.

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 4:

Inflammopharmacology
<https://doi.org/10.1007/s10787-019-00673-7>

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



Protective effects of a polyphenol-enriched fraction of the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. on acute and persistent inflammatory pain

Allisson Benatti Justino¹ · Mônica Soares Costa¹ · André Lopes Saraiva¹ · Pedro Henrique Silva¹ · Thiago Neves Vieira¹ · Priscilla Dias¹ · Camila Rodrigues Borges Linhares² · Paula Dechichi³ · Veridiana de Melo Rodrigues Avila¹ · Fouad Salmen Espindola¹ · Cassia Regina Silva¹

Received: 4 October 2019 / Accepted: 21 November 2019

© Springer Nature Switzerland AG 2019

Abstract

Different parts of *Annona crassiflora* Mart., a native species from Brazilian savanna, were traditionally used for the treatment of a wide variety of ailments including arthritis. Thus, this study aimed to investigate the possible antinociceptive and anti-inflammatory properties of a polyphenol-enriched fraction of the fruit peel of *A. crassiflora*, named here as EtOAc, in mice. Pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) production were evaluated in LPS-activated macrophages. Then, EtOAc fraction was administered by oral route in male C57BL/6J mice, and the animals were submitted to glutamate-induced nociception and complete Freund's adjuvant (CFA)-induced monoarthritis tests to assess nociception (mechanical, spontaneous and cold pain) and inflammation (edema and neutrophil infiltration), and to the open-field and rotarod tests for motor performance analysis. EtOAc fraction inhibited the production of IL-6 and NO in the LPS-induced macrophages, and reduced spontaneous nociception induced by glutamate, without altering the animals' locomotor activity. In addition, the polyphenol-enriched fraction was able to revert the early and late hyperalgesia induced by CFA, as well as edema at the acute phase. Reduction of myeloperoxidase activity and inflammatory cell infiltration was observed in the paw tissue of mice injected with CFA and treated with EtOAc fraction. Together, our results support the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel and suggest that these effects are triggered, at least in part, by suppressing pro-inflammatory cytokines and neutrophils infiltration.

Keywords Araticum · Arthritis · Flavonoids · Glutamate · Inflammation · Pain

Introduction

Pain is the most common complaint in the medical field, which impairs the quality of life of many patients (King and Fraser 2013). Among the different types of pain,

inflammatory pain such as that experienced in arthritis represents a chronic condition that most often affects the world's population (Brennan-Olsen et al. 2017), and the use of complete Freund's adjuvant (CFA) has been employed as a rodent model to study new therapies for inflammatory pain (Oliveira et al. 2014; von Banchet et al. 2007; Wandji et al. 2018).

The treatment of inflammatory pain mainly consists of the use of nonsteroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids and analgesics like opioids (Emery 2006; Guo et al. 2018; Khanna et al. 2017; Lee 2013). However, many of the pharmacological treatments currently available have undesirable side effects such as gastric discomfort, hypersensitivity reactions, gastric erosion and increased susceptibility to infection (McDougall 2006; Oliveira et al. 2014; Ong et al. 2007). Thus, over the past decade, numerous studies have shown that compounds derived from natural products like higher plants are potentially interesting for

✉ Cassia Regina Silva
cassia.regina@ufu.br

¹ Graduate Program in Genetics and Biochemistry, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlândia, Av. Pará 1720, Campus Umuarama, Jardim Umuarama, Bloco 2E, Office room 224, Uberlândia, MG 38408-100, Brazil

² Graduate Program in Odontology, Faculty of Odontology, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

³ Department of Cellular Biology, Histology and Embryology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, MG 38400-902, Brazil

Published online: 16 December 2019

Springer

therapeutic interventions in various inflammatory diseases (Budovsky et al. 2015; Calixto et al. 2005; Middleton 1998; Quintans et al. 2014). Examples are the phenolic compounds, such as flavonoids, which are known to have anti-inflammatory activity in mammalian cells. Also, their anti-inflammatory action is associated with their antioxidant capacity and ability to reduce the production of pro-inflammatory cytokines and nitric oxide (NO) (Hughes et al. 2017; Kim et al. 1999; Serafini et al. 2010).

In this sense, our group has concentrated efforts in the search for new bioactive molecules from natural products effective in the treatment of pain and inflammation (da Silva et al. 2015; de Moura et al. 2018; Silva et al. 2013). An example is the *Annona crassiflora* Mart. plant, belonging to the Annonaceae family, a native species of the Brazilian savanna. The fruit is popularly known as araticum, and the infusion of some parts of this plant is used by traditional medicine in the treatment of different clinical conditions, including inflammatory pain such as arthritis, wounds, venereal diseases, snakebites and microbial infections (Silva et al. 2014b; Vilar et al. 2008). However, scientific reports demonstrating analgesic and anti-inflammatory effects of this species are still limited, and da Costa Oliveira et al. (2018) have previously demonstrated the anti-inflammatory and antinociceptive effects of hydroalcoholic fractions obtained from *A. crassiflora* leaves.

Recently, we conducted a pre-purification of the crude ethanol extract of *A. crassiflora* fruit peel, obtaining a non-cytotoxic polyphenol-enriched fraction (EtOAc) (Justino et al. 2016). HPLC–ESI–MS/MS analysis suggested the presence of various phenolic compounds in EtOAc fraction, such as caffeoyl-glucoside, (epi)catechin, feruloyl-galactoside, quercetin-glucoside, kaempferol and B-types procyanidins (Justino et al. 2016). In addition, we showed that EtOAc fraction had pro-fibrogenic capacity, antioxidant activities and anti-inflammatory properties in tissue repair (de Moura et al. 2018; Justino et al. 2017). Since antioxidant inducers and ROS scavengers are expected to have or enhance antihyperalgesic activity (Singh and Vinayak 2015), we decided to investigate the effects of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel on animal models of acute and persistent pain.

Therefore, in this investigation, we first evaluated the protective effects of all the fractions obtained from *A. crassiflora* fruit peel on interleukin tumor necrosis factor α (TNF- α), IL-6 and NO production from lipopolysaccharide (LPS)-activated macrophages. Furthermore, we also evaluated the antinociceptive potential of EtOAc fraction in the glutamate-induced nociception, as well as its anti-inflammatory/antiarthritic properties in CFA-induced inflammatory pain in mice (Cavalcanti 2017; Oliveira et al. 2014).

Material and methods

Drugs and reagents

Reagents and solvents of analytical grade were purchased from Sigma (Sigma, St Louis, MO, USA) or from local suppliers. Water used was Milli-Q® obtained by deionized water that was filtered on a millipore filter.

Preparation of plant material and liquid-liquid fractioning

Fruits of *A. crassiflora* were collected in the north region of Minas Gerais State, in March 2017. The plant was identified by André Vito Scatigna from the Biology Institute of the Federal University of Uberlândia, Uberlândia-MG, Brazil. A voucher specimen (HUFU68467) was deposited in the herbarium of this Institution. The peels of *A. crassiflora* fruit were separated from pulps, and the dried and powdered peels (1.0 kg) were extracted by the maceration method for 3 days with 98% ethanol (EtOH) (6 L) in room temperature. This process was performed two times. After filtration, ethanol was removed using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-210, Switzerland) in a water bath at 40 °C under reduced pressure (49.7 g, 4.97%). The crude EtOH extract (10.0 g) was resuspended in a methanol:water (MeOH:H₂O) solution (9:1, v/v⁻¹, 150 mL), filtered and submitted to a liquid-liquid extraction according to Justino et al. (2016) using *n*-hexane (4 × 150 mL, 0.17 g), dichloromethane (CH₂Cl₂) (4 × 150 mL, 0.31 g), ethyl acetate (EtOAc) (4 × 150 mL, 2.71 g), and *n*-butanol (*n*-BuOH) (4 × 150 mL, 2.65 g). The extractive solvents were removed using a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C and the fractions were frozen and lyophilized to remove the remaining water.

Animals

Male C57BL/6J/UFU mice, weighing 20–25 g at 6 weeks of age, were used in the experiments. Animals were housed in a controlled environment (22 ± 2 °C) with a 12-h light/dark cycle (lights on between 6:00 AM and 6:00 PM) and fed standard laboratory chow and tap water ad libitum. The animals were acclimatized to the experimental room for at least 1 h before the experiment. Each animal was used only once. All animal handling and procedures complied with the ARRIVE guidelines and were approved by the Ethics Committee in Animal Experimentation of the Federal University of Uberlândia (CEUA/UFU-105/17, March 26th, 2018). The number of animals and intensity of noxious stimuli used were the minimum necessary to achieve the consistent effects of drug treatment, in accordance with current ethical

guidelines for the investigation of experimental pain in conscious animals (Zimmermann 1983). Behavioral observations were performed in a blind fashion by investigators.

Generation of bone marrow-derived macrophages (BMDM)

This method was based on Larmonier et al. (2003). Macrophages were obtained by differentiation of bone marrow cells from 6–8-week-old male C57BL/6 mice. Bone marrow cells were extracted by flushing bone cavity with RPMI 1640 into a 15 mL sterile polypropylene tube. The cells were homogenized and the cell suspension was centrifuged (400×g for 8 min, 4 °C). The pellet was homogenized in RPMI-1640 supplemented with 20% of fetal bovine serum (Gibco), 2 mmol L⁻¹ L-glutamine, 100 U mL⁻¹ penicillin, 100 µg mL⁻¹ streptomycin and 30% L929-cell-conditioned medium (LCCM), which was used as a source of macrophage colony-stimulating factor (M-CSF). Cells were kept at 37 °C and 5% CO₂ atmosphere until total differentiation (5–7 days); 5.0×10⁶ cells were cultured to generate BMDM. BMDM were collected after 4 days by removing the supernatant of culture dishes and detaching adherent cells using sterile ice-cold phosphate-buffered saline (PBS).

Analysis of nitric oxide (NO), IL-6 and TNF-α production

Cells were transferred to 96-well plates and treated with different concentrations of *n*-hexane, CH₂Cl₂, EtOAc and *n*-BuOH fractions of *A. crassiflora* fruit peel (0.1, 0.3, 1.0 µg mL⁻¹). After 24 h, macrophages were stimulated by LPS (100 ng mL⁻¹) and 6 h after collection of the supernatant, the levels of inflammatory mediators (nitric oxide, IL-6 and TNF-α) were analyzed. The accumulation of nitrite, an indicator of the production of nitric oxide, was determined by a colorimetric assay using the Griess reaction (Granger et al. 1996). IL-6 and TNF-α were detected using mouse-specific IL-6 and TNF-α DuoSet kit according to the manufacturer's protocol (R&D System). The fraction that showed higher inhibitory potential against NO, IL-6 and TNF-α was used in the *in vivo* assays.

Glutamate-induced nociception

An acute model of pain induced by intraplantar (ipl) injection of glutamate (10 µmol/paw) was used in the right hind paw of mice; the final volume of injections was 20 µL (Cavalcanti 2017). For this assay, three groups of animals were pre-treated orally (gavage) with the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel (EtOAc, 10, 30 and 100 mg kg⁻¹, diluted in distilled water) 30 min before

ipl injection of glutamate. The control group received ipl glutamate injection (10 µmol/paw) and oral treatment with vehicle. Immediately after the injections, the animals were placed in flat glass chambers (9×11×13 cm) and the nociceptive response (licking time and paw shaking) was timed for 30 min and the results were expressed as time of nociceptive responses in seconds (s). The dose of EtOAc fraction that presented the best antinociceptive effect in this test was used in the evaluation of the other parameters throughout the study.

CFA-induced inflammatory arthritic pain

As a model of acute and chronic arthritis pain, intraplantar (ipl) injection of complete Freund's adjuvant (CFA) was performed according to Oliveira et al. (2014). The animals received ipl injection of 20 µL of CFA [1 mg mL⁻¹ heat-killed *M. tuberculosis* in paraffin oil (85%) and mannide monooleate (15%)] in the right hind paw. The nociceptive parameters observed at 1, 2, 4, 6 and 24 h after CFA injection were considered as acute responses, while the chronic response was evaluated 48 h after CFA administration. The animals were orally treated (gavage) with 30 mg kg⁻¹ EtOAc fraction and, 30 min after, received the CFA injection; after 48 h, the same animals were treated again with EtOAc and pain measures were done 1, 2, 4, 6 and 24 h after this second treatment. The control group received the ipl injection of CFA and was treated with vehicle. The antinociceptive effect of treatment tested was evaluated through several nociceptive parameters: static mechanical allodynia, spontaneous nociception and cold allodynia.

Mechanical nociception

Animals were habituated in individual clear glass boxes (9×7×11 cm) on elevated wire mesh platforms to access the ventral surface of the hind paws. The mechanical sensitivity was then analyzed with Von Frey filaments (0.008–6 g) applied to the surface of the right hind paws of the animals. Paw withdrawal threshold was determined using the up-and-down method described by Chapman et al. (1994), with modifications. When the animal responded to the stimulus, the next small filament was used, and when the animal did not respond to the stimulus, the next largest filament was used. The weakest filament able to elicit a response was considered to be the mechanical nociceptive threshold (log mg). Withdrawal thresholds were verified at several time points after CFA injection (acute and chronic phases, as cited above) and were compared with the baseline values (before CFA injection).

Spontaneous nociception

To evaluate spontaneous nociception, prior to mechanical sensitivity measurements, the animals were classified according to their behavior to support the paw corresponding to the paw injected on a spontaneous nociception on a scale that varies from 0 to 3, according toCoderre and Wall (1987), with modifications. In this scale, 0 is considered for bodyweight normally distributed on all four paws; 1 for bodyweight slightly deposited on the tip of the injected paw; 2 for bodyweight deposited on the injected paw put aside and 3 for fully recovery leg corresponding to the injected paw.

Cold nociception

The cold sensitivity of the animals was evaluated by a stimulus using acetone (20 µl), according to Caspani et al. (2009), with modifications. For this purpose, paw licking and shaking responses of the animal were observed and chronometer after cooling caused by the evaporation of acetone topically applied to the right hind paw. The results were expressed as time of nociceptive responses in seconds (s).

Paw edema

The paw edema induced by CFA injection was considered as the paw thickness increase, measured with a digital caliper (Silva et al. 2016). Paw thickness was verified at several time points after CFA injection, at acute and chronic phases, and compared to baseline values. The results were expressed as paw thickness (mm). The caliper position was done in all the measures in the center of the hind paw.

Neutrophil infiltration

To assess the neutrophil infiltration in paw tissue, paw skin samples were collected 4 h after vehicle or CFA intraplantar injection (4.5 h after treatment with 30 mg kg⁻¹ EtOAc fraction (p.o.)), and the myeloperoxidase (MPO) activity was evaluated. First, samples were obtained and homogenized with a motor-driven homogenizer in sodium acetate buffer containing 0.5% HTAB and kept at 4 °C, centrifuged and the supernatant was then incubated with acetate buffer and 3,3'5,5' tetramethylbenzidine for 3 min at 37 °C. The reaction was assessed by a spectrophotometer at 630 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA). The values were expressed as optical densities, corrected for the protein content, which was measured according to Bradford (1976).

Histological analyses

Paw samples were collected 4 h after CFA injections [4.5 h after treatment with 30 mg kg⁻¹ EtOAc fraction (p.o.)]

and fixed in 10% formaldehyde in 0.1 mol L⁻¹ phosphate-buffered saline for 24 h. The paws were demineralized in 4.13% EDTA pH 7.4 solution for 4 weeks, and then embedded in paraffin wax. From each paw, six semi-serial histological sections were obtained (5 µm) and stained with hematoxylin-eosin (H&E) ($n=4$ animals/group). All histological sections were scanned with the Aperio AT Turbo Scanner (Copyright 2013 Leica Biosystems Imaging, Inc. Nußloch, Baden-Württemberg/Alemanha) at a magnification of 20×. Three random fields were observed in each H&E-stained slide to quantify the inflammatory cells (polymorphonuclear leukocytes) presence in the dermis layer at the paw tissue using NIH Image J 13.6 software (NIH, Bethesda, MD, USA). The results were expressed as the number of polymorphonuclear cells per field.

Open-field and rotarod tests

We also performed the open-field and rotarod tests to exclude the possible nonspecific muscle relaxant or sedative effects of EtOAc fraction over spontaneous or forced locomotor activity, respectively (De Pra et al. 2017). Mice were tested in an apparatus equipped with a rotating bar (speed = 5 turns/min; diameter = 1 cm; length = 5 cm). All animals were first submitted to a section of training where animals with three or more falls during a 120 s section were excluded. 24 h later, animals were treated with 30 mg kg⁻¹ EtOAc fraction (p.o.), vehicle or 10 mg kg⁻¹ diazepam (p.o.) 120 min before the rotarod test. The experiment lasted 2 min ($n=6$ /group). The number of falls and latency to the first fall from the apparatus were recorded for a duration of 240 s. In the open-field test, the open-field apparatus consisted of a box measuring (28 × 18 × 12 cm) with a floor that was divided into 15 identical areas. The animals were treated with 30 mg kg⁻¹ EtOAc fraction (p.o.) or vehicle. Two hours later, the animals were transferred to the apparatus and observed for 5 min. The number of areas crossed with all paws (crossings) and the number of rearing responses were recorded.

Statistical analysis

The statistical analyses and graphics were done using GraphPad Prism 6.0 software. All analyses were performed in triplicate and the data were expressed as mean ± standard error. The significance of difference was calculated using one-way and two-way ANOVA, and Dunnett's and Tukey's post-tests for multiple comparisons, and Kruskal-Wallis test and Dunn's post-test for non-parametric data. Values of $p < 0.05$ were considered significant.

Results

Extraction and liquid-liquid partition yield

The total yield of the crude ethanol extract of the *A. crassiflora* fruit peels was approximately 5% (~50 g of crude extract for every 1 kg of dried peel). Among the organic fractions from the crude ethanol extract of *A. crassiflora* fruit peel, *n*-hexane, CH_2Cl_2 , EtOAc and *n*-BuOH fractions showed yields of about 2, 3, 25.5 and 25% (in relation to the crude extract), respectively.

Effect of EtOAc fraction on nitric oxide, IL-6 and TNF- α production

Because inflammatory stimulus induces the release of different inflammatory mediators such as cytokines and nitric oxide, being also involved in tissue destruction during the progression of arthritis (Jiang et al. 2014), all fractions from ethanol crude extract of *A. crassiflora* fruit peel were first tested for *in vitro* nitric oxide (NO), IL-6 and TNF- α production (Fig. 1). LPS stimulated NO, IL-6 and TNF productions in the differentiated macrophages ($p < 0.001$). The treatments with EtOAc fraction at concentrations of 0.1 and 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and *n*-BuOH at 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ reduced NO (Fig. 1b) and IL-6 (Fig. 1d) production in the LPS-stimulated macrophages ($p < 0.001$); *n*-hexane and CH_2Cl_2 fractions were not able to reduce NO neither IL-6. With regard to TNF- α , no reduction in its production was observed with the treatment in the LPS-stimulated macrophages (Fig. 1f). Interestingly, LPS-induced macrophages treated with CH_2Cl_2 showed increase in NO and IL-6 levels at 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$, and in TNF- α at 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. *n*-Hexane also stimulated IL-6 (at 0.3 and 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and TNF- α production (at 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) in the LPS-induced macrophages. With regard to the macrophages without LPS induction, CH_2Cl_2 (at 0.3 $\mu\text{g mL}^{-1}$) and *n*-BuOH (at 0.1 $\mu\text{g mL}^{-1}$) fractions stimulated NO production (Fig. 1a). Since EtOAc fraction did not stimulate NO, IL-6 and TNF- α productions and was able to reduce their production in the LPS-stimulated macrophages, this fraction was used for the *in vivo* assays.

Effect of EtOAc fraction on glutamate-induced nociception

To investigate the possible antinociceptive *in vivo* effects of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel, acute nociception induced by intraplantar glutamate injection was tested, since glutamate receptors and NO have been implicated in nociception induction (Leong et al. 2000; Meller et al. 1996; Zimmermann 1983). A dose-response

curve was constructed with EtOAc fraction administered by the oral route. As shown in Fig. 2, glutamate at 10 μmol 20 μL^{-1} per paw induced a licking behavior characterizing nociception development, which was reduced by the oral administration of EtOAc fraction at 30 and 100 mg kg^{-1} ($p < 0.05$), with inhibitions of 75 and 44%, respectively. The dose of 30 mg kg^{-1} was selected to perform the next experiments.

Effects of EtOAc fraction on inflammatory arthritic pain

To evaluate the possible antinociceptive effect of EtOAc fraction in acute and persistent pain, mice were injected with CFA and we observed the development of early and late mechanical hyperalgesia, when compared with the baseline measure, characterized by a significant reduction in the paw withdrawn threshold when the von Frey filaments were applied to the injected paw ($p < 0.01$) (Fig. 1a, d). The pre-treatment of mice with EtOAc fraction (30 mg kg^{-1} , p.o.) presented a reduction in the early hyperalgesia induced by CFA (2.0–4.0 h after its administration, $p < 0.01$) (Fig. 1a). Furthermore, EtOAc fraction (30 mg kg^{-1} , p.o.) was able to revert the late hyperalgesia induced by CFA (1.0–6.0 h after its administration, $p < 0.05$) (Fig. 1d). In addition, EtOAc fraction reduced the cold nociceptive responses at 4 h (acute and chronic phases, $p < 0.05$), indicated by the decrease in the paw licking and shaking when the injected paw was exposed to acetone (Fig. 3b, e). However, spontaneous pain was similar between the groups at both acute and chronic phases (Fig. 3c, f, respectively).

Effects of EtOAc fraction on inflammation induced by CFA

Mice injected with CFA presented edema characterized by paw thickness increase, when compared with baseline measure, mainly at 24 and 48 h after CFA injection (3.9 ± 0.1 to 4.5 ± 0.2 mm, $p < 0.05$) (Fig. 4a, b). The pre-treatment with EtOAc fraction prevented the edema formation caused by CFA at 2, 4 and 24 h after its administration in the acute phase ($p < 0.05$) (Fig. 4a). EtOAc fraction was not able to reduce the edema development in the chronic phase (4b).

To verify if the reversal of hyperalgesia and edema promoted by EtOAc fraction (30 mg kg^{-1} , p.o.) was also associated with a reduction in leukocyte infiltration, 4 h after CFA injection the infiltration of leukocyte was assessed by the measurement of myeloperoxidase activity (MPO, marker for neutrophils) in the hind paw tissues. CFA increased the MPO activity when compared with the vehicle group ($p < 0.001$) (Fig. 4c). The treatment decreased this inflammatory parameter with an inhibition of $40 \pm 12\%$ (Fig. 4c).

In addition, we performed the histological analysis to confirm the leukocyte infiltration at the paw tissue, at 4 h

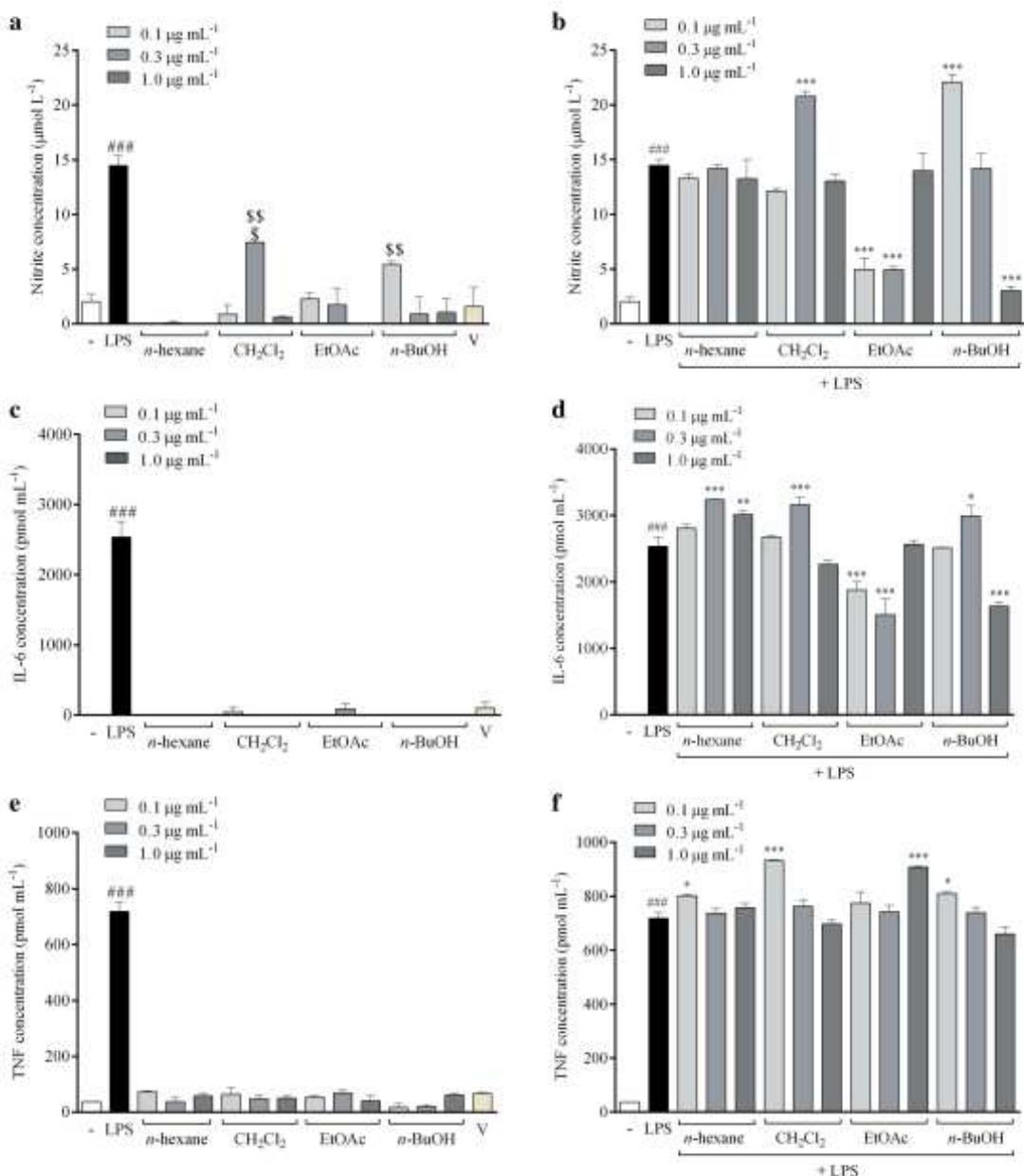


Fig. 1 Effect of organic fractions of *Annona crassiflora* fruit peel on NO (a), IL-6 (e) and TNF (e) production by differentiated macrophages and LPS-stimulated differentiated macrophages (b, d, f). Columns represents the mean ± SEM. Significance levels are indicated by *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 when compared to

LPS-stimulated untreated cells (LPS); *p < 0.05, **p < 0.01 and ***p < 0.001 fraction versus control (one-way ANOVA and Dunnett as post-test). - Control without LPS and fraction, EtOH ethanol crude extract, n-hexane hexane fraction, CH₂Cl₂ dichloromethane fraction, EtOAc ethyl acetate fraction, n-BuOH n-butanol fraction, V vehicle

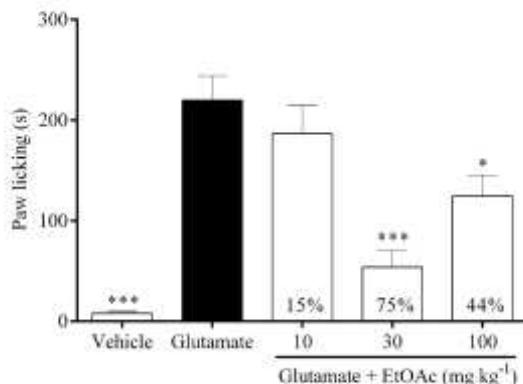


Fig. 2 Effect of the oral treatment of mice with the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* peel (EtOAc, 10–100 mg kg⁻¹, p.o.) or vehicle (10 mL kg⁻¹, p.o.) on pain behavior induced in mice by intraplantar administration of glutamate ($n=6$). Columns represent the mean \pm SEM, with percentage values of paw licking reduction. ANOVA followed by Dunnett as post-test, * $p<0.05$, *** $p<0.001$ compared with the glutamate group. EtOAc ethyl acetate fraction

after CFA injection. Here, we observed that CFA increased the leukocyte infiltration at the paw skin tissue when compared to the vehicle group (control) (Fig. 6). The number of infiltrated inflammatory cells was lower in the group treated with EtOAc fraction (30 mg kg⁻¹, p.o.) when compared with the group that received only CFA, with an inhibition of $40 \pm 9\%$ ($p<0.001$) (Fig. 5).

Motor coordination in open-field and rotarod tests

In addition, Table 1 shows that motor performance was not significantly influenced by EtOAc fraction treatment (30 mg kg⁻¹, p.o.) in comparison to the vehicle group.

Discussion

The use of plants with medicinal properties as analgesic and anti-inflammatory agents has gained prominence in the control and treatment of acute and chronic pain conditions (Maroon et al. 2010; Quintans et al. 2014). Whole plants or

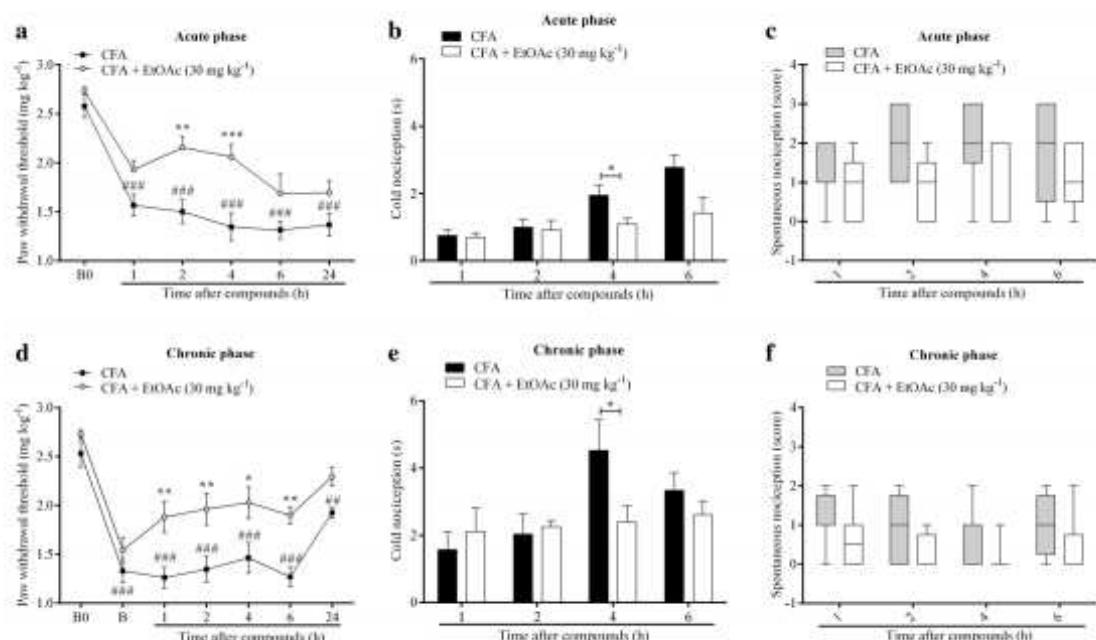


Fig. 3 Time response of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* peel (EtOAc, 30 mg kg⁻¹, p.o.) on mechanical hypersensitivity, cold hyperalgesia and spontaneous nociception at acute (1–24 h after intraplantar injection of CFA) (a–c, respectively) and chronic (48–72 h after intraplantar injection of CFA) (d–f, respectively) phases in mice ($n=8$). EtOAc fraction was administered 0.5 h before CFA injection and 48 h after CFA injection. B0 denotes the baseline threshold before intraplantar injection of CFA and oral

administration of EtOAc fraction, and B denotes the threshold 48 h after intraplantar injection of CFA and before the second oral administration of EtOAc fraction. Results expressed as mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ when compared with the baseline (B0) group; * $p<0.05$, ** $p<0.01$ and *** $p<0.001$ compared with the group that received only the intraplantar injection of CFA. EtOAc ethyl acetate fraction

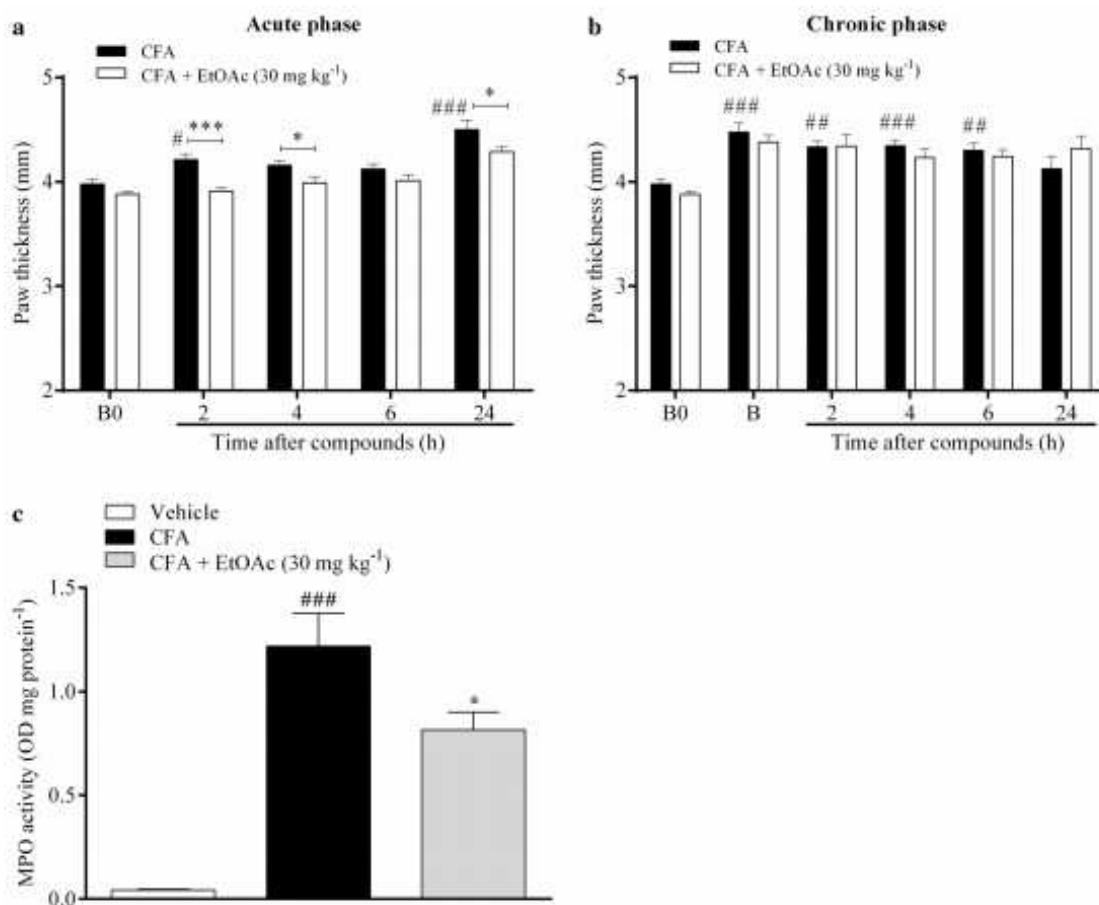


Fig. 4 Time response of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* peel (EtOAc, 30 mg kg⁻¹, p.o.) on paw edema induced by intraplantar injection of CFA in mice ($n=8$) at acute (1–24 h after intraplantar injection of CFA) (a) and chronic (48–72 h after intraplantar injection of CFA) (b) phases in mice ($n=8$). EtOAc fraction was administered 0.5 h before CFA injection and 48 h after CFA injection. B0 denotes the baseline threshold before intraplantar injection of CFA and oral administration of EtOAc fraction, and B denotes the threshold 48 h after intraplantar injection of CFA and before the second oral administration of EtOAc fraction. c shows the myeloperoxidase activity of paw tissue of mice 4 h after vehicle or CFA intraplantar injection and 4.5 h after treatment with EtOAc fraction ($n=4$). Columns represent the mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test and one-way ANOVA followed by Dunnett as post-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ when compared with the baseline (B0) or vehicle group; * $p<0.05$ and *** $p<0.001$ compared with the group that received only the intraplantar injection of CFA. EtOAc ethyl acetate fraction

second oral administration of EtOAc fraction. c shows the myeloperoxidase activity of paw tissue of mice 4 h after vehicle or CFA intraplantar injection and 4.5 h after treatment with EtOAc fraction ($n=4$). Columns represent the mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test and one-way ANOVA followed by Dunnett as post-test. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$ when compared with the baseline (B0) or vehicle group; * $p<0.05$ and *** $p<0.001$ compared with the group that received only the intraplantar injection of CFA. EtOAc ethyl acetate fraction

mixtures/extracts of plants are used rather than isolated compounds due to the access may being more affordable than acquiring isolated molecules (Wagner and Ulrich-Merzenich 2009). Also, the synergistic interaction or multi-factorial effects between compounds present in herbal extracts may increase the biological effects.

Annona crassiflora Mart. is a medicinal plant popularly used in the treatment of inflammatory and painful ailments such as rheumatism, wounds, venereal diseases, snake bites and microbial infections (Silva et al. 2014a; Vilar et al. 2008). However, little is shown in the literature about the

anti-inflammatory and analgesic effects of this plant, more specifically its fruit peel. Thus, we seek to confirm the popular use of this plant and evaluate the possible mechanisms that the fruit peel may exert in in vitro and in vivo models of acute and persistent inflammatory pain. Here, we demonstrated for the first time the protective effects of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel (EtOAc fraction) on IL-6 and NO production from LPS-activated macrophages. Furthermore, we also observed the antinociceptive effects of EtOAc fraction on the glutamate-induced nociception, as well as on the inflammatory acute

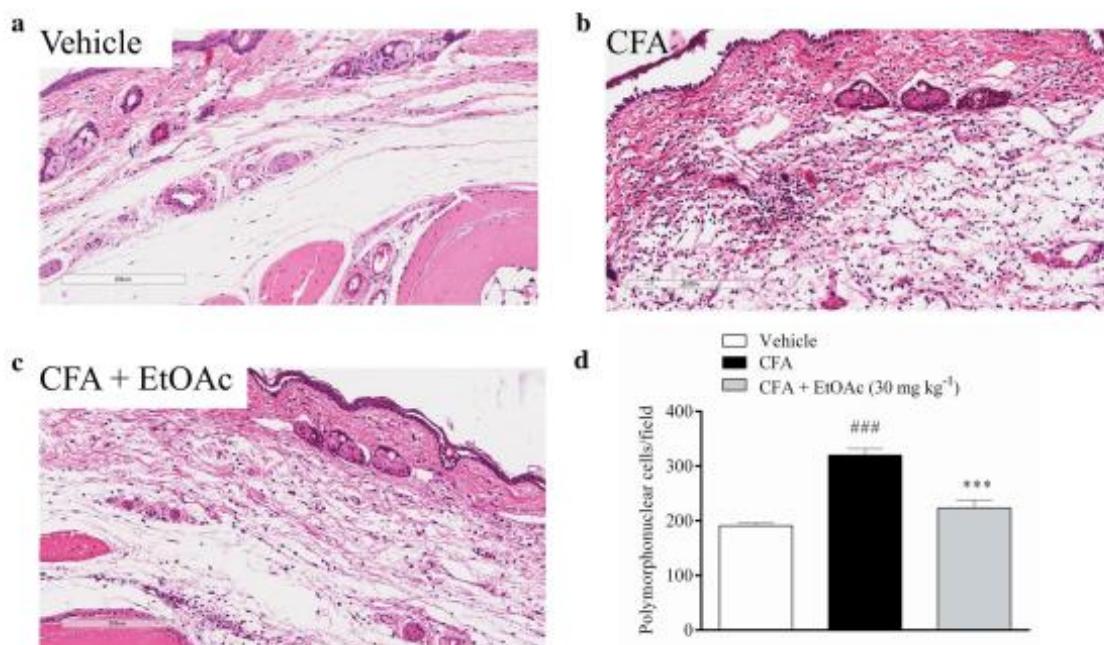


Fig. 5 Effect of the oral administration of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* peel on polymorphonuclear cell infiltration. Representative light microphotographs of paw tissue of mice treated only with vehicle (10 mL kg^{-1} , p.o.) (a), 4 h after CFA intraplantar injection (b) and 4 h after CFA intraplantar injection and 4.5 h after treatment with EtOAc fraction (30 mg kg^{-1} , p.o.) (c).

Representative graph of the number of polymorphonuclear cells per field (D). Each column represents the mean \pm SEM for four animals. ANOVA followed by Dunnett as post-test, *** $p < 0.001$ compared with vehicle group, *** $p < 0.001$ compared with the group that received only the intraplantar injection of CFA. EtOAc ethyl acetate fraction

Table 1 Spontaneous (open-field) and forced (rotarod) locomotor activity observed 1 and 2 h, respectively, after the administration of vehicle (10 mL kg^{-1} , p.o.), EtOAc fraction (30 mg kg^{-1} , p.o.) or the positive control diazepam (10 mg kg^{-1} , p.o.) ($n=4$)

Treatment	Open-field		Rotarod
	Crossings	Rearings	Latency to first fall
Vehicle 10 mL kg^{-1}	45.3 ± 8.6	11.3 ± 2.7	$120 \pm 6 \text{ s}$
EtOAc fraction 30 mg kg^{-1}	53.2 ± 2.6	10.5 ± 2.2	$120 \pm 10 \text{ s}$
Diazepam 10 mg kg^{-1}	—	—	$42 \pm 16^* \text{ s}$

Results expressed as mean \pm SEM ANOVA followed by Tukey post hoc test, * $p < 0.05$ compared to vehicle group

and persistent pain induced by CFA in mice. Also, we demonstrated that EtOAc has anti-inflammatory effects protecting from CFA-induced edema development and neutrophil infiltration *in vivo*.

A previous study showed the presence of the major phenolic compounds in the EtOAc and *n*-BuOH polar fractions, such as quinic acid, caffeoyl-glucoside, (epi)catechin, procyanidin B2 and feruloyl-galactoside, which were identified in

both fractions (Justino et al. 2016). In addition, procyanidin C1, quercetin-glucoside, kaempferol-rutinoside and kaempferol-glucoside were identified in EtOAc fraction, whereas citric and chlorogenic acids were identified only in *n*-BuOH fraction (Justino et al. 2016). The phytochemical characterization of EtOAc and *n*-BuOH fractions of *A. crassiflora* fruit peel using HPLC–ESI–MS/MS corroborated their high total phenolic, flavonoid, and proanthocyanidin contents (Justino et al. 2016), contributing to the improvement observed in the nociceptive and inflammatory parameters. Furthermore, the most apolar *n*-hexane and CH_2Cl_2 fractions were also previously analyzed showing the presence of alkaloids, stephalagine being the major isoquinoline alkaloid (Pereira et al. 2017). Interestingly, the CH_2Cl_2 alkaloidal fraction stimulated NO production in the macrophages. Some studies have shown the role of aporphine alkaloids in NO production via inducible NO synthase pathway (Chang et al. 2004; Lau et al. 2015; Zhu and Qian 2006). *n*-BuOH fraction also increased NO levels in the macrophages, which may be attributed to the presence of chlorogenic acid, since previous studies showed that this phenolic compound increased the production of NO (Jiang et al. 2016; Yamagata 2018).

Several studies suggest that inflammatory mediators as cytokines and NO are important for acute and persistent pain at both, peripheral and central levels (Beirith et al. 2002; da Silva et al. 2011; Rossato et al. 2019; Singh and Vinayak 2015; Spiller et al. 2019). In this way, we first observed that the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel was able to reduce NO and IL-6 production in the LPS-stimulated macrophages. However, this is not observed for TNF- α . These are different cytokines with different control pathways, therefore we are using a fraction extracted from a natural product where different molecules can be found, not necessarily inhibiting all inflammatory cytokines. In accordance, a large number of phenolic compounds have been reported to inhibit the secretion and expression of pro-inflammatory cytokines, and modulate NO bioavailability by acting on the expression and/or activity of the NO-producing enzymes (Duarte et al. 2014; Leyva-López et al. 2016). Some studies have demonstrated that proanthocyanidins and flavonoids, like those found in EtOAc fraction such as catechin, kaempferol and quercetin, including their glycosylated forms, reduced NO, IL-6 and TNF- α secretion levels in LPS-stimulated macrophages (Leyva-López et al. 2016). Anti-inflammatory effects of flavonoids by inhibiting expression and secretion of cytokines and NO are involved with modulation of transcriptional factors such as factor nuclear kappa B (NF- κ B) and activator protein 1 (AP-1), and inhibition of inducible NO synthase (iNOS), respectively (Duarte et al. 2014; Härmäläinen et al. 2007; Leyva-López et al. 2016; Limtrakul et al. 2016; Olszanecki et al. 2002; Sanchez-Fidalgo et al. 2013). Nevertheless, more studies need to be done to clarify these mechanisms for the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel.

Following, it is well known that plant-derived polyphenols, specifically flavonoids, have antinociceptive and anti-inflammatory effects in different pain models, with suggested modulation of glutamate receptors, NO and pro-inflammatory cytokines production (de Oliveira et al. 2016; Duarte et al. 2014; Leyva-López et al. 2016). Thus, we decided to investigate the antinociceptive potential of EtOAc fraction in a glutamate-induced acute nociception model. We observed that EtOAc fraction at 30 and 100 mg kg $^{-1}$ prevented glutamate-induced pain when administered by the oral route. Glutamate is a major excitatory neurotransmitter in the central nervous system (Coderre 1993). The glutamate receptors are important in the peripheral, spinal, and supraspinal nociceptive neurotransmission, which is mediated by both *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) and non-NMDA receptors, as well as by the release of NO and NO-related substances, which may produce hyperalgesia (Beirith et al. 2002). The antinociceptive effects of EtOAc fraction can be attributed to the presence of flavonoids in this fraction (Ali Khan et al. 2018). Quercetin and epicatechin, which are present in EtOAc fraction, are reported to

inhibit glutamate-induced nociception through mechanisms that involve interaction with L-arginine-nitric oxide, serotonin, and GABAergic systems (Filho et al. 2008; Lopes et al. 2012). Hence, an effect of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel directly on the receptors or second messengers related to these transmitters could avoid the nociceptive response. The effect of *A. crassiflora* fruit peel against nociception induced by glutamate is of great interest, since glutamate plays a significant role in nociceptive processing in both central and peripheral nervous systems (Millan 1999).

Interestingly, the antinociceptive/anti-inflammatory effects were observed when EtOAc was given within a very limited dose range. This may be justified by the fact that these activities are not achieved by the major compounds present in the fraction at lower concentrations. Also, when the amount of EtOAc exceeded a certain point, its therapeutic impact declined. At high concentrations, there may be multi-factors and more complex biological effects, such as antagonistic effects among the compounds present in the fraction mixture, multiple binding sites or multiple targets that form colloidal aggregates at relevant concentration, which may contribute to the loss of activity at higher concentrations (Owen et al. 2014).

We also explored the antinociceptive and anti-inflammatory potential of EtOAc fraction in a CFA-induced inflammatory acute and persistent pain model. Inflammatory stimuli such as CFA induce a cascade of inflammatory mediators such as cytokines, resulting in inflammatory hyperalgesia, which is exacerbated pain intensity, and allodynia, which is a pain to an innocuous stimuli (Cunha et al. 2005; Loeser and Treede 2008). In accordance with our hypothesis, the treatment of 30 mg kg $^{-1}$ EtOAc fraction reduced the acute and persistent allodynia induced by CFA, which is also in agreement with the antinociceptive effects of the EtOAc fraction in glutamate test. In addition, the polyphenol-enriched fraction diminished the cold hyperalgesia response of mice injected with CFA. Additionally, another important component of inflammatory pain is the oxidative stress, and it has been demonstrated that antioxidant therapy and reactive oxygen species (ROS) scavengers are considered for their possible antinociceptive activities (Cai et al. 2013; Singh and Vinayak 2015; Trevisan et al. 2014). In this sense, we have previously observed the antioxidant potential of EtOAc fraction (Justino et al. 2016).

Furthermore, the mice that received the intraplantar CFA injection presented a marked increase in paw thickness, which was reverted by EtOAc fraction at the acute phase of CFA-induced inflammation. Of note, the treatment with the EtOAc fraction was able to not only reduce paw oedema but also prevent the neutrophil infiltration induced by CFA. The increase in myeloperoxidase activity (which is an indirect evidence for neutrophil infiltration) was observed in the inflamed paw tissue

4 h after CFA injection. In accordance with our myeloperoxidase activity findings, cell infiltration was also confirmed by histological analysis, demonstrating leukocyte infiltration, at least up to 4 h after CFA injection. The oral administration of EtOAc fraction (30 mg kg^{-1}) reduced MPO activity, which was reinforced by histological analyses that showed a reduction in the infiltrated inflammatory cells of mice injected with CFA and treated with the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel. Thus, the antinociceptive action of EtOAc fraction appears to be associated with a local anti-inflammatory action. The findings suggest that EtOAc fraction presents notable anti-inflammatory and antinociceptive activities that may be mediated by suppressing pro-inflammatory cytokines and neutrophils infiltration.

These anti-inflammatory effects observed for *A. crassiflora* fruit peel may have been mediated by proanthocyanidins and flavonoids present in the polyphenol-enriched fraction, such as quercetin and catechin, which previously showed significant effects on the subchronic and chronic process of adjuvant arthritis and played a role by inhibiting the release of NO, IL-1 and IL-6 (Guardia et al. 2001; Jhun et al. 2013). The anti-inflammatory mechanism of flavonoids is attributed to their chemical structures, e.g., a planar ring system in molecule, unsaturation in the C ring at the C2–C3 position and the number and position of OH groups at the A and B rings (Hämäläinen et al. 2007; Leyva-López et al. 2016). Therefore, being able to downregulate cytokine expression and secretion represents a very promising alternative to be used as a treatment of inflammatory-related diseases such as arthritis.

It is also important to note that EtOAc fraction at 30 mg kg^{-1} did not demonstrate alterations in locomotor activities in mice as evidenced by the open-field and rotatory tests. Also, we have previously observed that the EtOAc fraction has no cytotoxicity when analyzed using the MTT test in vitro in NIH/3T3 fibroblast cells (Justino et al. 2016).

In conclusion, our results support the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the polyphenol-enriched fraction of *A. crassiflora* fruit peel without altering motor activity and suggest that these effects are triggered, at least in part, by suppressing pro-inflammatory cytokines and neutrophils infiltration. Thus, the current findings have strongly supported the claim that the fruit peel of *A. crassiflora*, a species from the Brazilian Savanna, a global biodiversity hotspot, possesses antiarthritic activity based on the data from the current results, which arises as an interesting natural source for inflammatory pain management.

Conflicts of interest

The authors declare no potential conflicts of interest with respect to the authorship and/or publication of this article.

Acknowledgments The authors would like to thank REBIR-UFG for the animal supply, infrastructure and services provided. This study was supported by grants from the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq). The fellowships from CNPq, Higher Education Personnel Improvement Coordination (CAPES) and Foundation for Research Support of the State of Minas Gerais (FAPEMIG) are also acknowledged.

References

- Ali Khan MS et al (2018) Anti-nociceptive mechanisms of flavonoid-rich methanolic extract from *Terminalia coriacea* (Roxb.) Wight & Arn. leaves. *Food Chem Toxicol* 115:523–531. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.03.021>
- Beirith A, Santos AR, Calixto JB (2002) Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 924:219–228
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248–254
- Brennan-Olsen SL et al (2017) Prevalence of arthritis according to age, sex and socioeconomic status in six low and middle income countries: analysis of data from the World Health Organization study on global AGEing and adult health (SAGE) Wave 1. *BMC Musculoskelet Disord* 18:271–271. <https://doi.org/10.1186/s12891-017-1624-z>
- Budovsky A, Yarmolinsky L, Ben-Shabat S (2015) Effect of medicinal plants on wound healing. *Wound Repair Regener* 23:171–183. <https://doi.org/10.1111/wrr.12274>
- Cai GH et al (2013) Antioxidant therapy for pain relief in patients with chronic pancreatitis: systematic review and meta-analysis. *Pain Phys* 16:521–532
- Calixto JB, Kassuya CA, Andre E, Ferreira J (2005) Contribution of natural products to the discovery of the transient receptor potential (TRP) channels family and their functions. *Pharmacol Ther* 106:179–208. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2004.11.008>
- Capsoni O, Zurborg S, Labus D, Heppenstall PA (2009) The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS ONE* 4:7383–7383. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0007383>
- Cavalcanti MF (2017) Antinociceptive and Anti-inflammatory Effects of the Hydroalcoholic Fraction from Leaves of *Cenostigma macrophyllum* Tul. var. *acuminata* Teles Freire (Leguminosae) in Rodents vol 8, doi:10.19080/OROAJ.2017.08.555733
- Chang WL, Chung CH, Wu YC, Su MJ (2004) The vascular and cardioprotective effects of liriodenine in ischemia-reperfusion injury via NO-dependent pathway. *Nitric Oxide Biol Chem* 11:307–315. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2004.10.004>
- Chaplan SR, Bach FW, Pogrel JW, Chung JM, Yaksh TL (1994) Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J Neurosci Methods* 53:55–63
- Coderre TJ (1993) The role of excitatory amino acid receptors and intracellular messengers in persistent nociception after tissue injury in rats. *Mol Neurobiol* 7:229–246. <https://doi.org/10.1007/bf02769177>
- Coderre TJ, Wall PD (1987) Ankle joint urate arthritis (AJUA) in rats: an alternative animal model of arthritis to that produced by Freund's adjuvant. *Pain* 28:379–393
- Cunha TM, Verri WA Jr, Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH (2005) A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:1755–1760. <https://doi.org/10.1073/pnas.0409225102>
- da Costa OC et al (2018) Anti-inflammatory and antinociceptive properties of the hydroalcoholic fractions from the leaves of *Annona*

- crassiflora Mart in mice. *Inflammopharmacology* 5:4. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0426-0>
- da Silva JF et al (2015) Characterization of the antinociceptive effect of PhTx3-4, a toxin from *Phoneutria nigriventer*, in models of thermal, chemical and incisional pain in mice. *Toxicol* 108:53–61. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.09.043>
- da Silva KA, Paszeuk AF, Passos GF, Silva ES, Bento AF, Meotti FC, Calixto JB (2011) Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha, beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice. *Pain* 152:1872–1887. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2011.04.005>
- de Moura FBR, Justino AB, Ferreira BA, Espindola FS, Araujo FA, Tomissso TC (2018) Pro-fibrogenic and anti-inflammatory potential of a polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* in skin repair. *Planta Med*. <https://doi.org/10.1055/a-0733-7151>
- de Oliveira DR, Zamberlan CR, Rêgo GM, Cavalheiro A, Cerutti JM, Cerutti SM (2016) Effects of a flavonoid-rich fraction on the acquisition and extinction of fear memory: pharmacological and molecular approaches front. *Behav Neurosci* 9:345–345. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2015.00345>
- De Pra SD et al (2017) Antinociceptive activity and mechanism of action of hydroalcoholic extract and dichloromethane fraction of *Amphilophium crucigerum* seeds in mice. *J Ethnopharmacol* 195:283–297. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2016.11.032>
- Duarte J, Francisco V, Perez-Vizcaino F (2014) Modulation of nitric oxide by flavonoids. *Food Funct* 5:1653–1668. <https://doi.org/10.1039/c4fo00144c>
- Emery P (2006) Treatment of rheumatoid arthritis. *BMJ* (Clinical research ed) 332:152–155. <https://doi.org/10.1136/bmj.332.7534.152>
- Filho AW, Filho VC, Olinger L, de Souza MM (2008) Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharm Res* 31:713–721. <https://doi.org/10.1007/s12272-001-1217-2>
- Granger DL, Taintor RR, Boockvar KS, Hibbs JB Jr (1996) Measurement of nitrate and nitrite in biological samples using nitrate reductase and Griess reaction. *Methods Enzymol* 268:142–151
- Guardia T, Rotelli AE, Juarez AO, Pelzer LE (2001) Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat Farmaco (Società chimica italiana : 1989) 56:683–687
- Guo Q, Wang Y, Xu D, Nossent J, Pavlos NJ, Xu J (2018) Rheumatoid arthritis: pathological mechanisms and modern pharmacologic therapies. *Bone Res* 6:15–15. <https://doi.org/10.1038/s41413-018-0016-9>
- Hämäläinen M, Nieminen R, Vuorela P, Heinonen M, Moilanen E (2007) Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, naringenin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. *Mediators of Inflammation* 2007:45673–45673. doi:10.1155/2007/45673
- Hughes SD, Ketheesan N, Haleagrahara N (2017) The therapeutic potential of plant flavonoids on rheumatoid arthritis. *Crit Rev Food Sci Nutr* 57:3601–3613. <https://doi.org/10.1080/1040398.2016.1246413>
- Jhun JY et al. (2013) Grape seed proanthocyanidin extract-mediated regulation of STAT3 protein contributes to Treg differentiation and attenuates inflammation in a murine model of obesity-associated arthritis. *PloS one* 8:e78843–e78843 doi:10.1371/journal.pone.0078843
- Jiang CP et al (2014) Anti-rheumatoid arthritic activity of flavonoids from *Daphne genkwa*. *Phytomedicine Int J Phytother Phytophar-macol* 21:830–837. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2014.01.009>
- Jiang R, Hodgson JM, Mas E, Croft KD, Ward NC (2016) Chlorogenic acid improves ex vivo vessel function and protects endothelial cells against HOCl-induced oxidative damage, via increased production of nitric oxide and induction of Hmox-1. *The Journal of nutritional biochemistry* 27:53–60 doi:10.1016/j.jnutbio.2015.08.017
- Justino AB et al. (2016) Peel of araticum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. *Bioorganic Chemistry* 69:167–182. <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2016.11.001>
- Justino AB et al. (2017) 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* doi:10.1021/acs.jafc.7b01355
- Khanna S, Jaiswal KS, Gupta B (2017) Managing rheumatoid arthritis with dietary interventions. *Front Nutr* 4:52–52. <https://doi.org/10.3389/fnut.2017.00052>
- Kim HK, Cheon BS, Kim YH, Kim SY, Kim HP (1999) Effects of naturally occurring flavonoids on nitric oxide production in the macrophage cell line RAW 264.7 and their structure-activity relationships. *Biochem Pharmacol* 58:759–765
- King NB, Fraser V (2013) Untreated pain, narcotics regulation, and global health ideologies. *PLoS medicine* 10:e1001411–e1001411 doi:10.1371/journal.pmed.1001411
- Larmonier N et al (2003) Freshly isolated bone marrow cells induce death of various carcinoma cell lines. *Int J Cancer* 107:747–756
- Lau YS, Ling WC, Murugan D, Mustafa MR (2015) Boldine ameliorates vascular oxidative stress and endothelial dysfunction: therapeutic implication for hypertension and diabetes. *J Cardiovasc Pharmacol* 65:522–531. <https://doi.org/10.1097/fjc.00000000000000185>
- Lee YC (2013) Effect and treatment of chronic pain in inflammatory arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 15:300–300. <https://doi.org/10.1007/s11926-012-0300-4>
- Leong S, Liu H, Yeo J (2000) Nitric oxide synthase and glutamate receptor immunoreactivity in the rat spinal trigeminal neurons expressing Fos protein after formalin injection. *Brain Res* 855:107–115. [https://doi.org/10.1016/s0006-8993\(99\)02316-1](https://doi.org/10.1016/s0006-8993(99)02316-1)
- Leyva-López N, Gutierrez-Grijalva EP, Ambriz-Perez DL, Heredia JB (2016) Flavonoids as cytokine modulators: a possible therapy for inflammation-related diseases. *Int J Mol Sci* 17:921. <https://doi.org/10.3390/ijms17060921>
- Limtrakul P, Yodkeeree S, Pitchakarn P, Punfa W (2016) Anti-inflammatory effects of proanthocyanidin-rich red rice extract via suppression of MAPK, AP-1 and NF-kappaB pathways in Raw 264.7 macrophages. *Nutrition research and practice* 10:251–258 doi:10.4162/nrp.2016.10.3.251
- Loeser JD, Treede RD (2008) The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. *Pain* 137:473–477. <https://doi.org/10.1016/j.pain.2008.04.025>
- Lopes LdS, Marques RB, Fernandes HB, Pereira SdS, Ayres MCC, Chaves MH, Almeida FRC (2012) Mechanisms of the antinociceptive action of (-)-epicatechin obtained from the hydroalcoholic fraction of *Combretum leprosum* Mart & Eic in rodents. *J Biomed Sci* 19:68–68 doi:10.1186/1423-0127-19-68
- Maroon JC, Bost JW, Maroon A (2010) Natural anti-inflammatory agents for pain relief. *Surgical neurology international* 1:80–80. <https://doi.org/10.4103/2152-7806.73804>
- McDougall JJ (2006) Arthritis and pain neurogenic origin joint pain. *Arthritis Res Ther* 8:220. <https://doi.org/10.1186/ar2069>
- Meller ST, Dykstra C, Gebhart GF (1996) Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of *N*-methyl-D-aspartate receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. *Neuroscience* 71:327–335. [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(95\)00442-4](https://doi.org/10.1016/0306-4522(95)00442-4)

- Middleton E Jr (1998) Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. *Adv Exp Med Biol* 439:175–182
- Millan MJ (1999) The induction of pain: an integrative review. *Prog Neurobiol* 57:1–164
- Oliveira SM et al (2014) Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav* 124:396–404. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2014.07.005>
- Olszanecki R, Gebka A, Kozłowski VI, Gryglewski RJ (2002) Flavonoids and nitric oxide synthase. *J Physiol Pharmacol* 53:571–584
- Ong CK, Lirk P, Tan CH, Seymour RA (2007) An evidence-based update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Clin Med Res* 5:19–34. <https://doi.org/10.3121/cmr.2007.698>
- Owen SC, Doak AK, Ganesh AN, Nedyalova L, McLaughlin CK, Shoichet BK, Shoichet MS (2014) Colloidal drug formulations can explain "bell-shaped" concentration-response curves. *ACS Chem Biol* 9:777–784 doi:10.1021/cb4007584
- Pereira MN et al. (2017) Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Industrial Crops and Products* 97:324–329 <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.12.038>
- Quintans JS, Antonioli AR, Almeida JR, Santana-Filho VJ, Quintans-Júnior LJ (2014) Natural products evaluated in neuropathic pain models—a systematic review. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 114:442–450. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12178>
- Rossato MF, Hoffmeister C, Trevisan G, Bezerra F, Cunha TM, Ferreira J, Silva CR (2019) Monosodium urate crystal interleukin-1 β release is dependent on Toll-like receptor 4 and transient receptor potential VI activation. *Rheumatology (Oxford, England)* doi:10.1093/rheumatology/kez259
- Sanchez-Fidalgo S et al (2013) Abaremena cochliacarpus reduces LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway. *J Ethnopharmacol* 149:140–147. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.06.013>
- Serafini M, Peluso I, Raguzzini A (2010) Flavonoids as anti-inflammatory agents. *Proc Nutr Soc* 69:273–278. <https://doi.org/10.1017/s002966511000162x>
- Silva JJ et al. (2014b) In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 56:333–340
- Silva CR et al. (2016) The role of kinin B1 receptor and the effect of angiotensin I-converting enzyme inhibition on acute gout attacks in rodents. *Ann Rheum Dis* 75:260–268 doi:10.1136/annrheumdis-2014-205739
- Silva CR et al (2013) The antinociceptive and anti-inflammatory effects of the crude extract of *Jatropha isabellaei* in a rat gout model. *J Ethnopharmacol* 145:205–213. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2012.10.054>
- Silva CPD, Souza MSB, Siguemoto ES, Soares RAM, Arêas JAG (2014a) Chemical composition and antioxidant activity of jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.) flour. *Food Science and Technology* 34:597–603
- Singh AK, Vinayak M (2015) Curcumin attenuates CFA induced thermal hyperalgesia by modulation of antioxidant enzymes and down regulation of TNF-alpha, IL-1beta and IL-6. *Neurochemical research* 40:463–472 doi:10.1007/s11064-014-1489-6
- Spiller F, Oliveira Formiga R, da Silva F, Coimbra J, Alves-Filho JC, Cunha TM, Cunha FQ (2019) Targeting nitric oxide as a key modulator of sepsis, arthritis and pain nitric oxide. *Biol Chem* 89:32–40. <https://doi.org/10.1016/j.miox.2019.04.011>
- Trevisan G et al. (2014) Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 387:679–689. DOI: 10.1007/s00210-014-0978-0.
- Vilar JB, Ferreira FL, Ferri PH, Guillo LA, Chen Chen L (2008) Assessment of the mutagenic, antimutagenic and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart 1841) by micronucleus test in mice. *Braz J Biol* 68:141–147
- von Banchet GS, Richter J, Huckel M, Rose C, Brauer R, Schaible HG (2007) Fibroblast-like synovial cells from normal and inflamed knee joints differently affect the expression of pain-related receptors in sensory neurones: a co-culture study. *Arthritis Res Ther* 9:R6. <https://doi.org/10.1186/ar2112>
- Wagner H, Ulrich-Merzenich G (2009) Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomed Int J Phytother Phytopharmacol* 16:97–110. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.12.018>
- Wandji BA, Bomba FDT, Nkeng-Efouet PA, Piegang BN, Kamanyi A, Nguelefack TB (2018) Anti-hyperalgesic activity of the aqueous and methanol extracts of the leaves of *Pittosporum mannii* Hook on CFA-induced persistent inflammatory pain. *Inflammopharmacology* 26:197–205. <https://doi.org/10.1007/s10787-017-0376-6>
- Yamagata K (2018) Do coffee polyphenols have a preventive action on metabolic syndrome associated endothelial dysfunctions? An Assessment of the Current Evidence. *Antioxidants (Basel)* 7:26. <https://doi.org/10.3390/antiox7020026>
- Zhu F, Qian C (2006) Berberine chloride can ameliorate the spatial memory impairment and increase the expression of interleukin-1 β and inducible nitric oxide synthase in the rat model of Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 7:78–78. <https://doi.org/10.1186/1471-2202-7-78>
- Zimmermann M (1983) Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* 16:109–110

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Anexo 5:

Hepatoprotective Properties of a Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Mart. Fruit Peel against Diabetes-Induced Oxidative and Nitrosative Stress

Allisson Benatti Justino,[†] Mariana Nunes Pereira,[†] Leonardo Gomes Peixoto,[†] Danielle Diniz Vilela,[†] Douglas Carvalho Caixeta,[†] Adrielle Vieira de Souza,[†] Renata Roland Teixeira,[†] Heitor Cappato Guerra Silva,[†] Francyelle Borges Rosa de Moura,[‡] Izabela Barbosa Moraes,[§] and Fouad Salmen Espindola^{*,†,‡,§}

[†]Institute of Genetics and Biochemistry, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

[‡]Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Uberlândia, Brazil

[§]Center of Biological Sciences and Health, Federal University of Oeste da Bahia, Barreiras, Brazil

Supporting Information

ABSTRACT: A polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* fruit peel (Ac-Pef) containing chlorogenic acid, (epi)catechin, procyanidin B2, and caffeoyl-glucoside was investigated against hepatic oxidative and nitrosative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. Serum biochemical parameters, hepatic oxidative and nitrosative status, glutathione defense system analysis, and *in silico* assessment of absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) of the main compounds of Ac-Pef were carried out. Ac-Pef treatment during 30 days decreased serum alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase, and alkaline phosphatase activities, as well as hepatic lipid peroxidation, protein carbonylation and nitration, inducible nitric oxide synthase level, and activities and expressions of glutathione peroxidase, superoxide dismutase, and catalase. There were increases in antioxidant capacity, glutathione reductase activity, and reduced glutathione level. ADMET predictions of Ac-Pef compounds showed favorable absorption and distribution, with no hepatotoxicity. *A. crassiflora* fruit peel showed hepatoprotective properties, indicating a promising natural source of bioactive molecules for prevention and therapy of diabetes complications.

KEYWORDS: Annonaceae, antioxidant, liver, natural products, nitrosative stress, oxidative stress

INTRODUCTION

Diabetes mellitus is a metabolic disorder characterized by hyperglycemia.¹ Chronic hyperglycemia is responsible for increased glucose autoxidation, oxidative phosphorylation, and the formation of advanced glycation end-products, which can induce oxidative and nitrosative stress reactions via the generation of reactive oxygen and nitrogen species (ROS and RNS, respectively).² Thus, hyperglycemia-induced oxidative stress may cause tissue damage, with the liver being the main organ affected by ROS.³ Hepatic cells have both enzymatic and nonenzymatic antioxidant systems to repair damage resulting from oxidative stress.⁴ The main antioxidant molecules in cells are glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH), and reduced glutathione (GSH).^{2,4,5} Studies suggested that when there are increases in ROS and RNS levels caused by a noncontrol of hyperglycemia, the oxidative and nitrosative species eventually overcome the endogenous antioxidant defense system, leading to an oxidant–antioxidant imbalance.^{6,7}

With regard to the generation of an oxidant–antioxidant imbalance in the liver caused by hyperglycemia, some studies using streptozotocin (STZ)-induced diabetes models showed metabolic disturbances affecting cell redox potential.^{8,9} The main consequences of the diabetes-induced stress are alterations in the

antioxidant enzymes such as GPx, SOD, CAT, and GR, as well as increases in lipid peroxidation, protein carbonylation, and inducible nitric oxide synthase (iNOS) content and decreases in G6PDH activity and GSH levels in the liver.^{8–11} Because of the importance of oxidative stress in diabetes mellitus and its complications, the administration of antioxidants has been postulated to prevent the damage caused by ROS and RNS.⁴ Thus, the discovery of more effective, accessible, and safer antioxidant agents from natural products becomes an attractive approach to the treatment and control of oxidative and nitrosative stress associated with diabetes.

Annona crassiflora (Mart.), a plant species from Annonaceae found in the Brazilian savannah, is used in traditional medicine for the treatment of rheumatism, wounds, venereal diseases, snakebites, and microbial infections.^{12,13} Previous studies have shown several biological properties of extracts from different parts of *A. crassiflora*, such as antibacterial, nematicidal, and antimalarial activities of leaf;^{14–16} larvicidal and molluscicidal actions of root, stem bark, and fruit;^{17,18} antimutagenic

Received: March 24, 2017

Revised: May 16, 2017

Accepted: May 17, 2017

Published: May 17, 2017

properties of leaf, root, and fruit seed,^{12,19} and antioxidant capacity of fruit seed and peel.^{20,21}

The fruit peel of *A. crassiflora* has been recently shown by our group as a source of alkaloids²² and polyphenols,²³ based on a liquid–liquid partitioning of its ethanol extract. Most of the polyphenols such as chlorogenic acid, (epi)catechin, procyanidins, caffeoyl-hexosides, and feruloyl-hexosides were concentrated in the *n*-butanol fraction, named here as the polyphenol-enriched fraction (Ac-Pef).²¹ These bioactive compounds in Ac-Pef contributed to its higher antioxidant capacity and lower cytotoxicity when compared to the other fractions and crude extract.²¹ However, the antioxidant analysis using the fruit peel of *A. crassiflora* was performed *in vitro*. Thus, the present study aimed to evaluate whether a polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel (Ac-Pef) decreases the hepatic oxidative and nitrosative stress caused by hyperglycemia in STZ-induced diabetic rats by examining serum biochemical parameters and hepatic antioxidant capacity, lipid peroxidation, protein carbonylation, and nitration, as well as GPx, SOD, CAT, GR, G6PDH, GSH, and iNOs contents and activities. In addition, *in silico* assessment of the absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity (ADMET) profiles of the main compounds of Ac-Pef was carried out.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Ethanol (>95%), hexane (99%), dichloromethane (99.5%), ethyl acetate (99.5%), *n*-butanol (>99.5%), methanol (>99.8%), hydrochloric acid (37%), and formaldehyde (37%) were purchased from Vetec Química Fina Ltda (Duque de Caxias, Rio de Janeiro, Brazil). Streptozotocin (298%), sodium citrate dihydrate (>99%), sodium chloride (>99%), sodium dihydrogen phosphate (>98%), disodium hydrogen phosphate (>98%), potassium phosphate monobasic (>99%), potassium phosphate dibasic (>98%), sodium acetate (>99%), 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (>98%), ferric chloride (97%), 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (97%), 2-thiobarbituric acid (>98%), malondialdehyde tetrabutylammonium salt (>96.0%), 2,4-dinitrophenylhydrazine (97%), trichloroacetic acid (>99%), guanidine hydrochloride (>98%), tris(hydroxymethyl)-aminomethane (>99.8%), EDTA (>98%), catalase from bovine liver, pyrogallol (>98%), superoxide dismutase from bovine erythrocytes, hydrogen peroxide solution (30%), Triton X-100, β -nicotinamide adenine dinucleotide 2'-phosphate reduced tetrasodium salt hydrate (>93%), L-glutathione oxidized (>98%), L-glutathione reduced (>98.0%), metaphosphoric acid (33.5–36.5%), α -phthalaldehyde (>99.8%), sodium azide (>99%), glutathione reductase from baker's yeast, sodium bicarbonate (>99%), tert-butyl hydroperoxide solution (70%), magnesium chloride anhydrous (>98%), β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrate (>95%), inositol glucose 6-phosphate disodium salt hydrate (98%), glycerol (299%), and sodium dodecyl sulfate (>98.3%) were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Ion-exchanged water was prepared using a Milli-Q Academic Water Purification System (Millipore Corp., Billerica, MA, USA).

Plant Material. Fruits of *A. crassiflora* were collected in natural resources of the Cerrado Biome in the northern region of Minas Gerais, Brazil, in March 2015, by a Cerrado native fruits merchant. A voucher specimen (HUFU68467) has been deposited in the herbarium of the Institute of Biology of the Federal University of Uberlândia, Brazil (Herbarium Uberlândense). The peels were carefully removed from *A. crassiflora* fruits and transported to the Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of the Federal University of Uberlândia and stored at -20°C for 7 days until the organic extraction and analysis.

Ethanol Extraction and Liquid–Liquid Partitioning. One kilogram of dried araticum peel was cut into small pieces and mixed with 5 L of 98% ethanol. The plant material was left macerating for 6 days, and the extractive solvent was removed using a rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-210, Flawil, Switzerland) in a water bath at 40°C under

reduced pressure. For the liquid–liquid partitioning, the ethanol extract (EtOH) was solubilized in methanol/water solution (9:1, v/v). Using a separatory funnel, the liquid–liquid partitioning was performed using increasingly polar solvents: hexane, dichloromethane, ethyl acetate, *n*-butanol, and water. The extractive solvents were removed using a rotary evaporator in a water bath at 40°C under reduced pressure; the fractions were frozen and lyophilized to remove the remaining water. The *n*-butanol fraction (Ac-Pef) was used for *in vivo* assays.

Animals. Male Wistar rats (about 7 weeks old and weighing 200–270 g) were kept under standard conditions ($22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ humidity, and 12 h light/12 h dark) and given food and water ad libitum. All animal experiments complied with the ARRIVE guidelines and were carried out in accordance with the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publication 8023, revised 1978). The procedures for the handling and use of the rats as proposed by the Brazilian Society of Laboratory Animal Science and by the Ethics Committee for Animal Research of the Federal University of Uberlândia, Brazil (CEUA/UFU 107/14) were adopted.

Diabetes Induction. The rats were subjected to 24 h of starvation and given an intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ, 45 mg kg⁻¹, dissolved in 0.01 mol L⁻¹ sodium citrate buffer, pH 4.5) to induce diabetes. Control group rats received the same volume of citrate buffer. Blood glucose was determined by taking blood, with a lancet, from the tail and measured using test strips (Accu-Chek Performa, Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) 10 days after the STZ injection. Rats with a fasting glucose level >250 mg dL⁻¹ were classified as diabetic.

Groups and Treatment. The rats were divided into six groups ($n = 6$ /group): nondiabetic control (ND), untreated diabetics (D), diabetics treated with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of Ac-Pef (D25, D50 and D100, respectively), and diabetics treated with 2 units of insulin (DI). Diabetic rats of the groups D25, D50, and D100 were treated with the polyphenol-enriched fraction diluted in filtered water by oral gavage, and DI animals were treated with insulin (Novolin N Human Insulin, NPH), once a day for 30 days (at 6:00 p.m.). ND and D rats received placebo preparations. The doses of Ac-Pef used in this study were based on previous studies that used *n*-butanol fraction from a plant extract for oral administration in rats.^{23,24} Insulin was used as standard due to STZ-induced diabetes model, which serve as a predictable animal model of type 1 diabetes mellitus.²⁵ An extra group (diabetics treated during 30 days with 2 units of insulin plus 100 mg kg⁻¹/day of Ac-Pef, $n = 6$) was also evaluated (Supporting Information). Body weight and glucose level were measured at the beginning and end of the study, and the rats had free access to food and water.

Serum Biochemical Parameters. At the end of the experiment, blood was collected and centrifuged at 1500g for 10 min to obtain serum for biochemical analysis: triglycerides, cholesterol, alkaline phosphatase (ALP), aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), and γ -glutaryltransferase (γ -GT). All of these parameters were measured at the Laboratory of Clinical Analyses, School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia, with an automatic analyzer (Cobas Mirra; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland), using commercial kits (Labtest Diagnóstica; Lagoa Santa, Brazil). Glucose levels were measured by tail vein puncture using reactive strips (Accu-Chek Performa; Roche Diagnostic Systems, Basel, Switzerland).

Tissue Preparation. The liver tissues were quickly removed, washed using normal saline (0.9% NaCl), and frozen by immersion in liquid nitrogen. For oxidative stress markers and Western blotting analyses, the samples were homogenized in phosphate buffer (1:10 w/v, pH 7.4). The homogenates were centrifuged at 800g for 10 min at 4°C , and the total protein concentration was measured in the supernatant samples according to the Bradford method.²⁶

Oxidative Stress Markers Analysis. Total Antioxidant Capacity. Hepatic total antioxidant capacity was evaluated by the ferric reducing antioxidant power (FRAP) method.²⁷ The antioxidants present in the samples reduce Fe³⁺ to Fe²⁺, which is chelated by 2,4,6-tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) to form an Fe²⁺-TPTZ complex. The liver homogenates were incubated with the FRAP reagent (10 volumes of 0.3 mol L⁻¹ sodium acetate buffer, pH 3.6, 1 volume of 10 mmol L⁻¹ TPTZ, and 1 volume of 20 mmol L⁻¹ ferric chloride) at 37°C for 6 min. The absorbance was measured at 593 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA).

Table 1. Body Weight and Glycemic Levels of Nondiabetic (ND) and STZ-Induced Diabetic (D) Rats and STZ-Induced Diabetic Rats Treated with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the Polyphenol-Enriched Fraction from *Ammonia crassiflora* Fruit Peel (D25, D50, and D100, Respectively) and Insulin (DI), Evaluated before and after 30 Days of Treatment^a

	initial body wt (g)	final body wt (g)	initial glycemia (mg dL ⁻¹)	final glycemia (mg dL ⁻¹)
ND	290.8 ± 10.8	348.7 ± 12.2 ^b	66.1 ± 2.3	56.1 ± 3.0 ^b
D	270.8 ± 9.6	271.7 ± 7.2	465.1 ± 29.0	560.7 ± 18.9
D25	257.3 ± 5.3	254.1 ± 7.0	434.9 ± 26.0	446.5 ± 50.7
D50	279.4 ± 8.2	280.4 ± 11.8	443.0 ± 32.5	441.8 ± 36.9
D100	274.8 ± 2.4	272.8 ± 9.6	437.9 ± 28.9	422.8 ± 44.6 ^c
DI	260.4 ± 5.7	308.7 ± 6.1 ^c	437.4 ± 27.2	147.5 ± 46.6 ^b

^aValues are expressed as the mean ± standard error. ^bP < 0.001 vs group D. ^cP < 0.05 vs group D.

Park, CA, USA); a blank absorbance value (from wells without liver homogenate) was subtracted from all absorbance values. Antioxidant activity was determined using an analytical curve, constructed with trolox as a standard.

Lipid Peroxidation. Lipid peroxidation was determined according to the thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) method by the reaction between malondialdehyde present in the liver samples (MDA) and thiobarbituric acid (0.67% TBA). The organic-phase fluorescence was measured at 515 nm_{ex} and 553 nm_{em} (PerkinElmer LS 55, Boston, MA, USA); a blank fluorescence value (from wells without liver homogenate) was subtracted from all fluorescence values. Lipid peroxidation was determined using an analytical curve constructed with MDA.²⁵

Protein Carbonylation. Carbonyls in proteins were identified by 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), precipitated with 10% trichloroacetic acid (TCA), washed with ethanol–ethyl acetate, and dissolved in 6 mol L⁻¹ guanidine hydrochloride. The absorbance values were registered at 370 nm (Molecular Devices, Menlo Park, CA, USA), and the protein carbonylation was determined according to the difference spectrum between sample treated with DNPH in HCl and sample treated with HCl alone.²⁶

Superoxide Dismutase Activity. SOD activity was assessed by the inhibition of autoxidation of pyrogallol by SOD present in the liver samples.³⁰ The liver homogenates were mixed with 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer (pH 8.2) containing 1 mmol L⁻¹ EDTA to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases, 80 U mL⁻¹ catalase, and 24 mmol L⁻¹ pyrogallol, and the kinetic assay was monitored during 10 min at 420 nm (Molecular Devices) using an analytical curve constructed with SOD as standard.

Catalase Activity. CAT activity evaluation was based upon hydrogen peroxide decomposition by CAT present in the liver samples.³¹ The liver homogenates were incubated with 10% Triton X-100 and mixed with 10 mmol L⁻¹ potassium phosphate buffer, pH 7.0, containing 0.2% hydrogen peroxide. The hydrogen peroxide decomposition was monitored at 240 nm during 10 min (PerkinElmer LS 55).

Glutathione Reductase Activity. GR activity was evaluated according to the consumption of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) using oxidized glutathione (GSSG) as substrate.³² The liver homogenates were mixed with 200 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer pH 7.5 containing 6.3 mmol L⁻¹ EDTA to inhibit metal-dependent enzymes such as metalloproteases, 10 mmol L⁻¹ oxidized glutathione, and 3 mmol L⁻¹ NADPH. The decay of NADPH concentration was evaluated for 10 min at 340 nm (Molecular Devices).

Reduced Glutathione Level. The proteins of the homogenate were precipitated by metaphosphoric acid, and the samples were centrifuged at 7000g for 10 min. The supernatant was mixed with 100 mmol L⁻¹ sodium phosphate buffer, pH 8.0, containing 5 mmol L⁻¹ EDTA, to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases, and 1 mg mL⁻¹ *o*-phthalaldehyde diluted in methanol. Fluorescence was measured at 350 nm_{ex} and 420 nm_{em} (PerkinElmer LS 55); a blank fluorescence value (from wells without liver homogenate) was subtracted from all fluorescence values. An analytical curve constructed with GSH as a standard was used to determine GSH content.²⁸

Glutathione Peroxidase Activity. GPx activity was measured according to the reduction of NADPH by GR that reduced a glutathione

disulfide bridge created by GPx present in the liver samples. The liver homogenates were incubated with GPx buffer (100 mmol L⁻¹ potassium phosphate, pH 7.7, containing 1 mmol L⁻¹ EDTA to deactivate metal-dependent enzymes such as metalloproteases), 40 mmol L⁻¹ sodium azide, 100 mmol L⁻¹ GSH diluted in 5% metaphosphoric acid, 4.5 U GR, diluted in GPx buffer, 2 mmol L⁻¹ NADPH diluted in 5% sodium bicarbonate, and 0.5 mmol L⁻¹ *tert*-butyl. The decay of NADPH was evaluated for 10 min at 340 nm (Molecular Devices).²³

Glucose-6-phosphate Dehydrogenase Activity. G6PDH activity was monitored by the production of NADPH with a consequent increase in absorbance at 340 nm. The liver homogenates were incubated with 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl buffer, pH 7.5, 2 mol L⁻¹ magnesium chloride, 0.5 mmol L⁻¹ NADP⁺, and 1 mmol L⁻¹ glucose-6-phosphate, and the kinetic assay was monitored during 10 min (Molecular Devices).²⁸

Western Blotting. Aliquots of supernatant samples were solubilized in an electrophoresis buffer, containing an additional 100 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0, and 25% glycerol. Twenty micrograms of total protein was loaded onto 5–22% denatured SDS-PAGE. Proteins were separated and transferred onto nitrocellulose membranes (Hybond ECL nitrocellulose membranes) for 2 h at 100 mA at 4 °C. Membranes were blocked for 4 h at 4 °C in blocking buffer (5% nonfat dry milk in PBS w/v) and incubated overnight at 4 °C with CAT, SOD, GPx, inducible nitric oxide synthase (iNOS), and nitrotyrosine (N-Tyr) primary antibodies (0.1 µg mL⁻¹). The samples were incubated with a peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (diluted 1:5000). Antibodies bound to the membranes were visualized by chemiluminescence (Amersham ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). The intensity of the protein bands was analyzed by ImageQuantTL software, and the results were expressed as densitometry.

Histological Analysis. Histology was determined by fixing the livers in 10% phosphate-buffered formalin, processing, embedding in paraffin, and then staining with hematoxylin and eosin (H&E). Stained slides were analyzed and captured on an Olympus microscope (Tokyo, Japan), equipped with an OPTICAM OPT 10 MP camera.

In Silico Pharmacokinetic Properties Prediction. The pharmacokinetic properties were predicted by pkCSM, an integrated platform that uses graph-based signatures, which are mathematical representations of chemical entities, from which different descriptors encompassing both molecule structure and chemistry can be extracted.³² These signatures were used to evaluate intestinal absorption, steady state volume of distribution (V_{dss}), fraction unbound, cytochrome P inhibition, oral rat acute toxicity (LD₅₀), oral rat chronic toxicity (LOAEL), and hepatotoxicity of procyanidin B2, epicatechin, catechin, chlorogenic acid, and caffeoyl-glucoside, which were identified in Ac-Pef by HPLC-ESI-MS/MS analysis.²¹

Statistical Analyses. All analyses were performed in triplicate, and the data were tested for normality using the Kolmogorov–Smirnov test. Data were analyzed using the one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey multiple-comparison as post-test. All analyses were performed in GraphPad Prism version 6.00 (San Diego, CA, USA). Only the values of p < 0.05 were considered significant. Results were expressed as the mean ± SEM.

Table 2. Serum Biochemical Parameters of Nondiabetic (ND) and STZ-Induced Diabetic (D) Rats and STZ-Induced Diabetic Rats Treated with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the Polyphenol-Enriched Fraction from *Annona crassiflora* Fruit Peel (D25, D50, and D100, Respectively) and Insulin (DI)^a

	ND	D	D25	D50	D100	DI
ALT (U L ⁻¹)	56.3 ± 3.3 ^b	143.2 ± 13.1	89.5 ± 7.2 ^b	100.8 ± 10.1 ^c	94.5 ± 11.6 ^c	56.0 ± 2.6 ^b
AST (U L ⁻¹)	129.6 ± 8.6 ^b	282.8 ± 7.2	129.8 ± 15.8 ^b	176.5 ± 50.3 ^b	184.7 ± 25.0 ^c	113.2 ± 10.3 ^b
γ-GT (U L ⁻¹)	4.7 ± 1.0 ^c	16.6 ± 2.3	7.8 ± 2.4	8.5 ± 2.1	6.5 ± 3.5	10.5 ± 3.7
ALP (U L ⁻¹)	170.8 ± 24.6 ^b	409.0 ± 61.3	302.4 ± 48.4	191.5 ± 23.8 ^b	353.3 ± 55.4	155.5 ± 11.5 ^b
triglycerides (mg dL ⁻¹)	58.1 ± 10.6 ^d	159.3 ± 28.1	124.2 ± 21.4	131.6 ± 22.0	117.0 ± 16.5	163.4 ± 26.6
cholesterol (mg dL ⁻¹)	54.4 ± 2.6	62.6 ± 2.9	50.6 ± 3.2	60.1 ± 4.3	56.6 ± 2.3	62.0 ± 4.8
HDL-cholesterol (mg dL ⁻¹)	22.0 ± 0.5	22.5 ± 1.9	24.0 ± 0.9	26.1 ± 2.2	26.2 ± 1.7	27.6 ± 1.1

^aValues expressed as the mean ± standard error. ALT, alanine aminotransferase; AST, aspartate aminotransferase; γ-GT, γ-glutamyltransferase; ALP, alkaline phosphatase. ^bP < 0.001 vs group D. ^cP < 0.01 vs group D. ^dP < 0.05 vs group D.

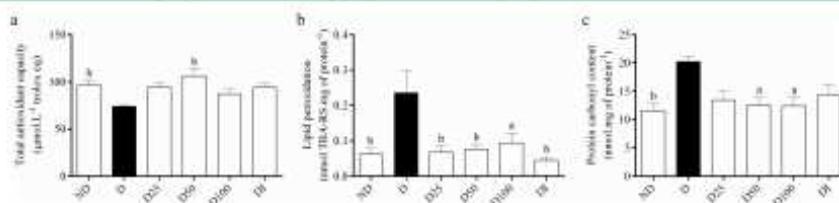


Figure 1. Analysis of total antioxidant capacity (a), lipid peroxidation (b), and protein carbonyl content (c) in the livers of nondiabetic (ND) and STZ-induced diabetic (D) rats and of STZ-induced diabetic rats treated during 30 days with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel (D25, D50, and D100, respectively) and insulin (DI). Values expressed as the mean ± standard error. Letters above bars: a, P < 0.05 versus group D; b, P < 0.01 versus group D; and c, P < 0.001 versus group D.

RESULTS

Extraction and Liquid–Liquid Partition Yield. The total yield of ethanolic extraction of the peels of *A. crassiflora* fruit was about 5%. From the ethanol extract, the n-butanol fraction resulting from the liquid–liquid partitioning, denoted here as the polyphenol-enriched fraction (Ac-Pef), showed a yield of approximately 60%.

Body Weight and Glycemic Parameters. The mean body weight of diabetic (D) rats was lower than that of nondiabetic (ND) controls ($P < 0.001$) (Table 1). Treatment with Ac-Pef did not change this parameter in the diabetic rats; the rats treated with insulin (DI) had increased body weight ($P < 0.05$). After 30 days of treatment, blood glucose levels of the D100 rats decreased when compared to D ($P < 0.05$), as well as DI ($P < 0.001$) (Table 1). Diabetic rats treated with insulin plus 100 mg kg⁻¹ showed no significant difference in mean values of body weight and glycemia in relation to nondiabetic rats (Table A.1, Supporting Information).

Serum Biochemical Parameters. The serum biochemical parameters are shown in Table 2. The diabetic rats (D) showed higher alanine aminotransferase (ALT) ($P < 0.001$), aspartate aminotransferase (AST) ($P < 0.001$), γ-GT ($P < 0.01$), and alkaline phosphatase (ALP) ($P < 0.001$) activities and triglyceride level ($P < 0.05$) than the nondiabetic rats (ND). The treatment with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of Ac-Pef (D25, D50, and D100, respectively) reduced ALT and AST activities ($P < 0.01$), whereas the treatment with 50 mg kg⁻¹ (D50) reduced ALP activity ($P < 0.001$), in comparison with diabetic rats, as well as the treatment with insulin. However, Ac-Pef did not reduce γ-GT activity and triglyceride levels, and neither did the insulin treatment. The total and HDL-cholesterol did not show significant differences among the groups. Diabetic rats treated with insulin plus 100 mg kg⁻¹ showed no significant difference in

mean values of the serum biochemical parameters in relation to nondiabetic rats (Table A.2, Supporting Information).

Oxidative Stress Markers Analysis. The diabetic rats showed lower hepatic antioxidant activity than nondiabetics ($P < 0.01$). The treatment with 50 mg kg⁻¹ of Ac-Pef elevated the antioxidant capacity ($P < 0.01$) (Figure 1a). Furthermore, the diabetes induced lipid peroxidation and elevated the protein carbonyl content ($P < 0.01$) (Figure 1b,c, respectively). All Ac-Pef doses (25, 50, and 100 mg kg⁻¹) were able to reduce lipid peroxidation ($P < 0.05$), whereas 50 and 100 mg kg⁻¹ of Ac-Pef reduced protein carbonyl content in the liver ($P < 0.05$). Diabetic rats treated with insulin showed no difference in total antioxidant capacity and protein carbonyl content.

The contents and activities of the hepatic antioxidant enzymes are shown in Figure 2. GPx, SOD, and CAT contents were higher in the D rats ($P < 0.05$) (Figure 2a,c,f, respectively). All Ac-Pef doses (25, 50, and 100 mg kg⁻¹) reduced SOD ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.01$, respectively) and CAT ($P < 0.05$) contents, whereas the doses of 50 and 100 mg kg⁻¹ reduced GPx content ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively). In addition, SOD and CAT activities were higher in D than in ND rats ($P < 0.05$) (Figure 2d,e, respectively). However, D25, D50, and D100 rats showed reductions in SOD and CAT activities when compared with D rats ($P < 0.05$, $P < 0.01$, and $P < 0.05$, respectively). Although ND rats showed no difference in GPx activity in relation to D rats (Figure 2c), the diabetics treated with all doses of Ac-Pef had lower GPx activity ($P < 0.05$). The treatment of diabetic rats with insulin reduced only GPx content ($P < 0.01$).

The hepatic glutathione reductase activity and reduced glutathione content were lower in the untreated diabetic rats (D) ($P < 0.05$ and $P < 0.01$, respectively) (Figure 3a,b). Treatment with 100 mg kg⁻¹ of Ac-Pef and insulin (D100 and DI, respectively) elevated the glutathione reductase activity ($P < 0.01$ and $P < 0.05$, respectively) and, consequently, the reduced

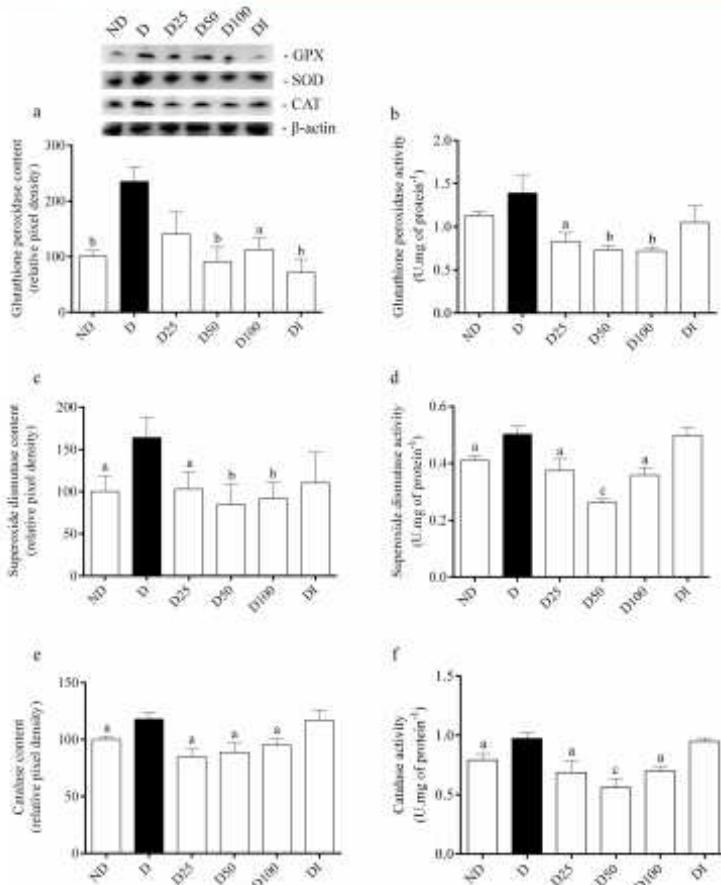


Figure 2. Analysis of glutathione peroxidase content (a) and activity (b), superoxide dismutase content (c) and activity (d), and catalase content (e) and activity (f) in the livers of nondiabetic (ND) and STZ-induced diabetic (D) rats and of STZ-induced diabetic rats treated during 30 days with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel (D25, D50, and D100, respectively) and insulin (DI). Values expressed as the mean \pm standard error. Letters above bars: a, P < 0.05 versus group D; b, P < 0.01 versus group D; and c, P < 0.001 versus group D.

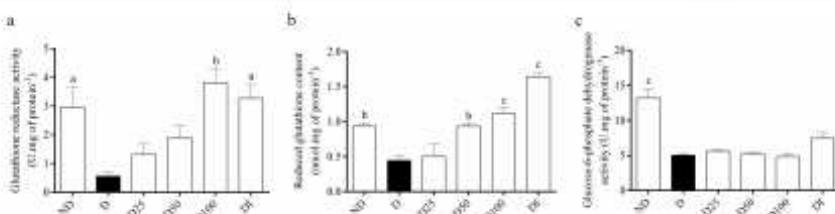


Figure 3. Analysis of glutathione reductase activity (a), reduced glutathione content (b), and glucose-6-phosphate dehydrogenase activity (c) in the livers of nondiabetic (ND) and STZ-induced diabetic (D) rats and of STZ-induced diabetic rats treated during 30 days with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel (D25, D50, and D100, respectively) and insulin (DI). Values expressed as the mean \pm standard error. Letters above bars: a, P < 0.05 versus group D; b, P < 0.01 versus group D; and c, P < 0.001 versus group D.

glutathione content ($P < 0.001$). In addition, the glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) activity was lower in D than in ND rats ($P < 0.001$) (Figure 1c); however, the rats treated with Ac-Pef (D25, D50, and D100 mg kg⁻¹) and insulin (DI) showed no difference in G6PDH in relation to D. Diabetic rats treated with insulin plus 100 mg kg⁻¹ showed no significant

difference in mean values of the oxidative stress parameters in relation to nondiabetic rats (Table A.3, Supporting Information).

Nitrosative Stress Markers Analysis. The hepatic iNOS and N-Tyr contents are shown in Figure 4. The untreated diabetic rats (D) showed higher iNOS content than nondiabetics (ND) ($P < 0.05$). Treatment with 25 and 50 mg kg⁻¹ Ac-Pef

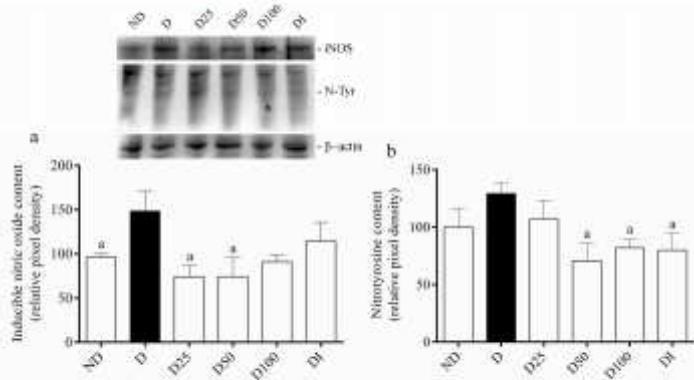


Figure 4. Analysis of inducible nitric oxide synthase (iNOS) (a) and nitrotyrosine (N-Tyr) (b) contents in the livers of nondiabetic (ND) and STZ-induced diabetic (D) rats and of STZ-induced diabetic rats treated during 30 days with 25, 50, and 100 mg kg⁻¹ of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel (D25, D50, and D100, respectively) and insulin (DI). Values expressed as the mean \pm standard error. Letters above bars: a, $P < 0.05$ versus group D; b, $P < 0.01$ versus group D; and c, $P < 0.001$ versus group D.

reduced the level of iNOS ($P < 0.05$) (Figure 4a). With regard to the protein nitration (Figure 4b), there was no difference of nitrotyrosine content between nondiabetic and untreated diabetic rats. However, the diabetic rats treated with 50 and 100 mg kg⁻¹ Ac-Pef and insulin showed lower N-Tyr content than D rats ($P < 0.05$).

Histological Analysis. Analysis of HE-stained liver slices (Figure 5) showed a general preservation of liver histoarchitecture, hepatocytes with a normal cytoplasmic eosinophilic aspect, and one or two nuclei with loose chromatin and evident nucleolus. Two individuals from D25 had dilated sinusoids, despite no other visual signs of hepatotoxicity being observed.

In Silico Pharmacokinetic Properties Prediction. The prediction of pharmacokinetic properties of procyanidin B2, epicatechin, catechin, chlorogenic acid, and caffeoyl-glucoside is shown in Table 3. All compounds showed intestinal absorption above 40% and had no interference of metabolism by binding families of cytochrome P enzymes. The predicted intestinal absorption was based on the original compounds. Furthermore, values of fraction unbound were above 0.2 Fu and VDss results above 0.5 log L kg⁻¹, with the exception of chlorogenic acid. Also, all polyphenols showed lower values of oral acute toxicity ($LD_{50} < 2.5 \text{ mol kg}^{-1}$) and oral chronic toxicity (LOAEL < log 4.4 mg kg⁻¹ bw day⁻¹), and presented no hepatotoxicity.

DISCUSSION

STZ damages pancreatic β -cells and results in diabetes mellitus, characterized by hyperglycemia and associated with the increased production of ROS and RNS.² The diabetic animals showed reduced body weight, total antioxidant capacity, GSH content, and GR and G6PDH activities. In addition, there were increases in glycemia, triglyceride level, and ALT, AST, γ -GT, and ALP activities, as well as in the contents and activities of SOD and CAT and in GPx and iNOS levels. This study reported the potential hepatoprotective effect of a polyphenol-enriched fraction obtained by a liquid–liquid partitioning of the ethanol extract of *A. crassiflora* fruit peel (Ac-Pef) by evaluating its antioxidant and antinitrosative effects on the hepatic tissue of diabetic rats. The *n*-butanol fraction was chosen in the present study because it had higher *in vitro* antioxidant capacity than

other fractions and crude ethanol extract of *A. crassiflora* fruit peel, as shown in a previous study conducted by our group.²¹

In the present investigation, Ac-Pef was not able to increase the body mass or control hyperglycemia of the diabetic rats (Table 1), indicating that this polyphenol-enriched fraction had no insulin-mimetic activity and/or capacity to repair pancreatic tissue. The Ac-Pef treatment was responsible for reducing the activities of serum ALT, AST, and ALP (Table 2). In relation to the oxidative and nitrosative stress parameters in hepatic tissue, reductions in lipid peroxidation, protein carbonylation, and nitration and iNOS content (Figures 1 and 4), as well as in GPx, SOD, and CAT activities and contents (Figure 2), were observed in the diabetic rats treated with Ac-Pef. In addition, there were increases in total antioxidant capacity (Figure 1) and GR activity and GSH levels (Figure 3), and the hepatic histoarchitecture was preserved.

The phytochemical characterization of *A. crassiflora* fruit peel by using HPLC-ESI-MS/MS showed the presence of several antioxidant biomolecules in Ac-Pef, such as chlorogenic acid, (epi)catechin, procyanidins, caffeooyl-hexosides, and feruloyl-hexosides,^{20,21,33,34} corroborating its high total phenolic, flavonoid, and proanthocyanidin contents (383 mg of gallic acid equiv g⁻¹, 45 mg of quercetin equiv g⁻¹, and 458 mg of catechin equiv g⁻¹, respectively).²¹ Furthermore, this polyphenol-enriched fraction previously presented high *in vitro* antioxidant capacity ($DPPH IC_{50} = 0.8 \pm 0.1 \mu\text{g mL}^{-1}$, ORAC $IC_{50} = 2714 \pm 79 \mu\text{mol trolox equiv g}^{-1}$, and FRAP $IC_{50} = 921 \pm 9 \mu\text{mol trolox equiv g}^{-1}$),²¹ contributing to the improvement observed in the parameters of oxidative/nitrosative stress in the present study. Phenolic compounds are considered beneficial for human health, reducing the risk of chronic-degenerative diseases by reducing oxidative and nitrosative stress and inhibiting oxidation and nitration of macromolecules.^{10,35} These compounds are able to scavenge free radicals and chelate metals, as well as modulate the genetic transcription and expression of certain antioxidant enzymes.^{4,10,36}

It is known that hyperglycemia causes structural and functional changes in the liver of diabetic animal models, as shown by Dey and Swaminathan.³⁷ In the present investigation, there were no alterations in hepatic histoarchitecture of the diabetic rats; no significant evidence of inflammation, necrosis, fibrosis, prolif-

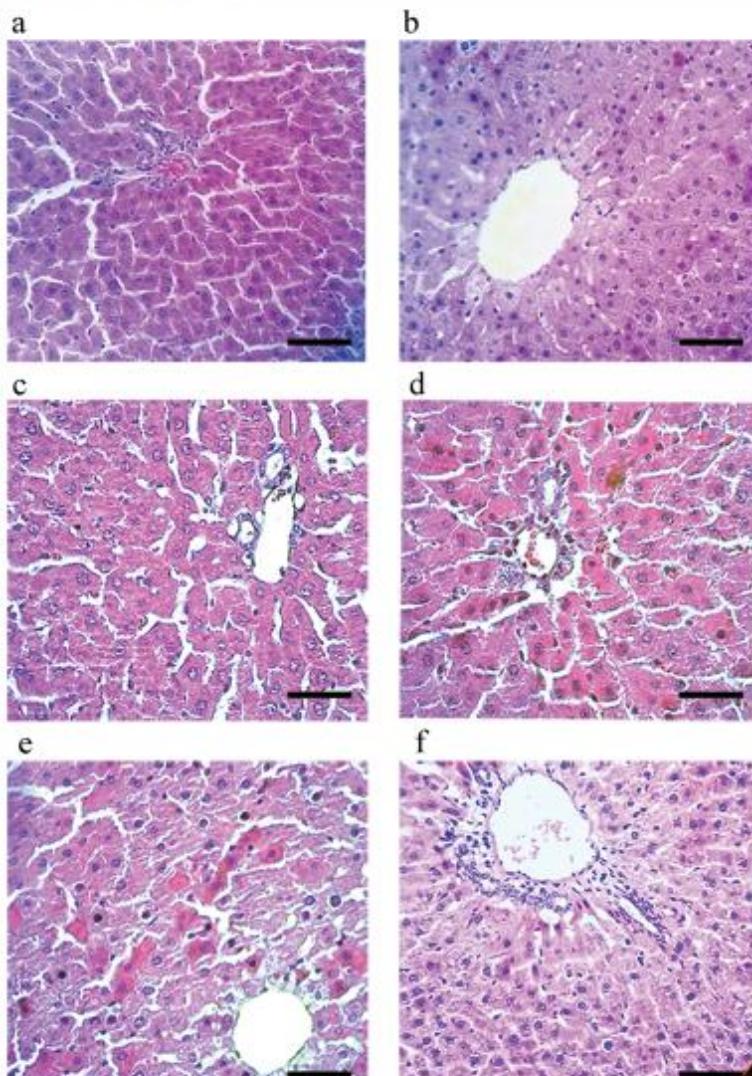


Figure 5. Photomicrographs of liver sections from nondiabetic control rats (ND) (a), untreated diabetics (D) (b), diabetics treated with 25 mg kg^{-1} (D25) (c), 50 mg kg^{-1} (D50) (d), and 100 mg kg^{-1} (D100) (e) of the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel, and diabetics treated with insulin (D1) (f). H&E (scale bar = $50 \mu\text{m}$). Central vein is shown in all images.

ation, destruction, or parenchyma regeneration was observed. This can be explained by the fact that damage in hepatic tissue due to diabetes occurs after a chronic period of about 12 weeks.³⁸ The aim of evaluating diabetic animals treated with Ac-Pef was also to elucidate possible hepatotoxic effects via histoarchitecture analysis, which are common by the use of natural products. However, we did not identify this effect for Ac-Pef.

Because the diabetic rats showed no alterations in hepatic histoarchitecture, the elevation of serum ALT and AST activities may be due to the damaging effect of hyperglycemia on organs other than the liver, such as skeletal muscle and kidney. However, increased ALP and γ -GT levels in the diabetic rats are associated with cholestasis due to stress-induced biliary obstruction.^{39,40} All

doses of Ac-Pef were able to reduce the activity of ALT and AST, whereas 50 mg kg^{-1} reduced ALP activity. The normalization of AST, ALT, and ALP may be due to the presence of flavonoids in Ac-Pef, because they are reported to be hepatoprotective agents.³⁵ In addition, the diabetic rats had higher triglyceride levels than the nondiabetic rats, as a consequence of insulin deficiency and hyperglycemia.⁴¹ Treatment with Ac-Pef was not able to reduce the levels of triglycerides because it had no effect on hyperglycemia. Total cholesterol and HDL-cholesterol levels did not present differences between D and ND rats, corroborating data from Holmgren and Brown.⁴²

Although ROS and RNS were not directly measured, our results showed an increase in lipid peroxidation and protein

Table 3. In Silico Pharmacokinetics Properties for Procyanidin B2, Epicatechin, Catechin, Chlorogenic Acid, and Caffeoyl-glucoside^a

compound	intestinal absorption (% absorbed)	VDss (log L kg ⁻¹)	fraction unbound (Fu)	CYP inhibition	LD ₅₀ (mol kg ⁻¹)	LOAEL (log mg kg ⁻¹ bw day ⁻¹)	hepatotoxicity
procyanidin B2	60.38	0.132	0.249	no	2.483	4.18	no
epicatechin	69.21	1.346	0.373	no	2.331	2.99	no
catechin	69.21	1.346	0.373	no	2.331	2.99	no
chlorogenic acid	42.52	-0.955	0.579	no	1.993	4.35	no
caffeoyle glucoside	50.44	0.141	0.616	no	1.920	4.34	no

^aIntestinal absorption, steady state volume of distribution (VDss), fraction unbound, cytochrome P enzymes (CYP) inhibition, oral rat acute toxicity (LD₅₀), oral rat chronic toxicity (LOAEL), and hepatotoxicity analysis. Cytochrome P enzymes: CYP1A2, CYP2C19, CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4.

carbonylation and nitration, indicating that STZ-induced hyperglycemia was capable of reducing antioxidant capacity and generating oxidative and nitrosative species, which are factors that trigger the pathogenesis of chronic diabetes mellitus.⁷ Lipid peroxidation increases under the pathological condition of diabetes.^{28,41} Under hyperglycemic conditions, glucose oxidizes and produces superoxide, leading to the production of free radicals that in turn cause lipid peroxidation in lipoproteins, impairing their functions due to the decrease in membrane fluidity.⁴² The formation of MDA equivalents was lower in diabetic rats treated with the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel. Previous studies have demonstrated the potential of chlorogenic acid and flavonoids such as procyanidins, which are present in Ac-Pef, in reducing lipid peroxidation and increasing antioxidant capacity in STZ-induced diabetic rats.^{33,34,43}

ROS and RNS can also damage proteins. The main molecular mechanisms that lead to protein damage are oxidation, characterized by the formation of carbonyls and nitrotyrosines, and loss of thiol groups.^{7,10,45} The conversion of proteins to protein carbonyl derivatives by direct oxidation caused by ROS may alter several cellular functions.⁴⁵ Here, untreated diabetic rats showed higher protein carbonyl content than nondiabetics, corroborating the results of Cumaoğlu et al.¹⁰ and Jang et al.⁴⁶ Administration of the polyphenol-enriched fraction from the fruit peel of *A. crassiflora* was able to reduce protein carbonylation in the liver. A study conducted by Tabassum et al.⁴⁷ showed that catechin, a flavonoid previously identified in Ac-Pef, prevented protein carbonylation in the liver, indicating its potential in inhibiting the formation of protein carbonyls.

In the present study, the activity and content of SOD and CAT and the GPx content were higher in untreated diabetic rats than in nondiabetics, in response to increased hepatic oxidative stress. The increase in GPx and CAT activity may have occurred as a compensatory response to an increase in endogenous H₂O₂ production in the liver of diabetic rats, because insulin deficiency promotes the oxidation of fatty acids with the consequent formation of oxygen peroxide.⁴⁸ The increase in SOD activity may have occurred due to the increased superoxide production, with H₂O₂ acting as a tissue SOD inducer.⁴⁹ Treatment with the polyphenol-enriched fraction from the fruit peel of *A. crassiflora* was able to reduce the content and activity of these antioxidant enzymes in diabetic rats. The phenolic compounds present in Ac-Pef,²¹ through ROS scavenging properties, may have been responsible for preventing elevation of GPx, SOD, and CAT in hepatic tissue. Our results corroborate studies that evaluated the antioxidant activity of α-lipoic acid and flavonoids on oxidative stress.^{43,49–51}

Although GPx, SOD, and CAT levels were increased in the liver of the untreated diabetic rats, their hepatic total antioxidant capacity was lower. This can be explained by the reduction in G6PDH and GR activities, as well as in GSH levels in the untreated diabetic rats, corroborating previous studies.^{8,9,52} The reduced activity of G6PDH observed in the liver of STZ-induced diabetic rats can be explained by the reduced secretion and action of insulin, because the activity of hepatic G6PDH varies proportionally according to insulin levels.⁹ Depletion of GSH level in diabetic rats may be due to its use to relieve oxidative stress in diabetes.⁵¹ With regard to the treatment using the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel, the results of the present study showed that the higher the dose, the higher the GR activity and GSH levels. Polyphenols, especially procyanidins, have the ability to stimulate GSH biosynthesis and/or reduce oxidative stress, leading to lower GSH depletion, as reported by Al-Numair et al.⁵² and Lee et al.⁵³ However, G6PDH activity remained reduced in the diabetic rats treated with Ac-Pef. As the rats treated with Ac-Pef remained hyperglycemic, our hypothesis is that there is a reduction of insulin secretion due to STZ, which may have contributed to a decrease in G6PDH activity, even using increasing doses of Ac-Pef.

Diabetes may also lead to increased hepatic iNOS expression, as observed in this study. The formation of NO may be a result of the activation of stress-sensitive signaling pathways, which can cause cellular damage and late complications of diabetes.⁵³ The combination of NO with superoxide radicals (O₂^{·-}) can lead to peroxynitrite (ONOO[·]), the formation of which is associated with the origin and progression of protein oxidative damage.⁷ Nitration of the ortho position of tyrosine is one of the main products of ONOO[·] attack on proteins, leading to nitrotyrosine formation (N-Tyr).^{2,7,11} The present study showed that untreated diabetic rats had no significant change in N-Tyr expression when compared to nondiabetics, similar to the results found by Chang et al.⁵⁴ However, treatment using the polyphenol-enriched fraction reduced both the iNOS and N-Tyr expressions. Previous studies demonstrated the potential of proanthocyanidins in the down-regulation of iNOS expression,^{43,49,55} which justifies the reduction of iNOS in diabetic rats treated with Ac-Pef.

The predicted properties of absorption, metabolism, and distribution showed favorable intestinal absorption (>40%) for all compounds,⁵² corroborating the data from Olthof et al.,⁵⁶ Actis-Goretta et al.,⁵⁷ and Spencer et al.,⁵⁸ which showed similar values of intestinal absorption for chlorogenic acid, epicatechin, and procyanidin B2. Furthermore, there was no negative interference in metabolism, because these compounds do not inhibit cytochrome P enzymes such as CYP1A2, CYP2C19,

CYP2C9, CYP2D6, and CYP3A4. Unbound fraction values were >0.24 Fu, indicating that this specified fraction of polyphenols does not bind to plasmatic proteins. The results of steady state volume of distribution (VD_{ss}) showed satisfactory distribution for procyanidin B2, epicatechin, catechin, and caffeoyl-glucoside.³² With regard to toxicity, all compounds showed no hepatotoxicity and low oral acute and chronic toxicities, corroborating data from Sundarrajan and Arumugam⁵⁹ and Yamakoshi et al.,⁶⁰ which showed low LD₅₀ values for catechin and procyanidin B2, respectively.

In summary, treatment with the polyphenol-enriched fraction from *A. crassiflora* fruit peel decreased ALT, AST, and ALP activities, lipid peroxidation, protein carbonylation, and nitration and iNOS content, as well as GPx, SOD, and CAT activities and contents. In addition, there were increases in total antioxidant capacity, GR activity, and GSH levels. Low contents of MDA and carbonylated proteins and normalization of the hepatic enzymatic and nonenzymatic antioxidant system in STZ-induced diabetic rats treated with Ac-Pef, combined with *in silico* pharmacokinetic analysis, confirm the previous *in vitro* analysis and the antioxidant effect of this treatment. Therefore, the results demonstrate the fruit peel of *A. crassiflora*, a native species from the Brazilian savannah, is a promising natural source of bioactive antioxidant molecules for clinical applications, including the prevention and therapy of diabetes complications. For clinical studies, extrapolation of dose from animals to humans needs consideration of body surface area, pharmacokinetics, and physiological time.⁶¹ Considering the dose by factor method, which is an empirical approach that uses the no observed adverse effect levels of drug from preclinical studies to estimate human equivalent dose, a dose of approximately 15 mg kg⁻¹ day⁻¹ could represent a starting dose for further human studies.

■ ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.7b01355.

Body weight and glycemic levels, serum biochemical parameters, and oxidative stress parameters of nondiabetics and diabetics treated with 2 U of insulin and 100 mg kg⁻¹/day of the polyphenol-enriched fraction from *Annona crassiflora* fruit peel evaluated before and/or 30 days post-treatment ([PDF](#))

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*F.S.E.: E-mail: foued@ufu.br. Phone: 55 (34) 3225-8439. Address: Universidade Federal de Uberlândia, Instituto de Genética e Bioquímica, Av. Para, 1720, CEP 38400-902 Uberlândia, MG, Brazil.

ORCID

Fouad Salmen Espindola: 0000-0001-7565-1164

Funding

This work was supported by the Foundation for Research Support of the Minas Gerais State (FAPEMIG – APQ-01856-14). A.B.J., D.D.V., D.C.C., A.V.S., H.C.G.S., and F.B.R.M. received graduate fellowships from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and FSE are grant recipients of CNPq (308965/2015-9).

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge the Center of Animal Experimentation (CBEA-UFU) of the Federal University of Uberlândia for supplying the animals and infrastructural support and Prof. Antonio Vicente Mundim (Laboratory of Clinical Analyses, School of Veterinary Medicine, Federal University of Uberlândia) for help in the serum biochemical analysis.

■ REFERENCES

- (1) Rolo, A. P.; Palmeira, C. M. Diabetes and mitochondrial function: role of hyperglycemia and oxidative stress. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2006, 212, 167–178.
- (2) Li, S.; Tan, H.-Y.; Wang, N.; Zhang, Z.-J.; Lao, L.; Wong, C.-W.; Feng, Y. The role of oxidative stress and antioxidants in liver diseases. *Int. J. Mol. Sci.* 2015, 16, 26087–26124.
- (3) Sanchez-Valle, V.; Chavez-Tapia, N. C.; Uribe, M.; Mendez-Sanchez, N. Role of oxidative stress and molecular changes in liver fibrosis: a review. *Curr. Med. Chem.* 2012, 19, 4850–4860.
- (4) Dey, A.; Lakshmanan, J. The role of antioxidants and other agents in alleviating hyperglycemia mediated oxidative stress and injury in liver. *Food Funct.* 2013, 4, 1148–1184.
- (5) Medina, J.; Moreno-Otero, R. Pathophysiological basis for antioxidant therapy in chronic liver disease. *Drugs* 2005, 65, 2445–2461.
- (6) Matsunami, T.; Sato, Y.; Sato, T.; Ariga, S.; Shimomura, T.; Yukawa, M. Oxidative stress and gene expression of antioxidant enzymes in the streptozotocin-induced diabetic rats under hyperbaric oxygen exposure. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2009, 3, 177–188.
- (7) Pacher, P.; Obrosova, I. G.; Mabley, J. G.; Szabo, C. Role of nitrosative stress and peroxynitrite in the pathogenesis of diabetic complications. Emerging new therapeutic strategies. *Curr. Med. Chem.* 2005, 12, 267–275.
- (8) Moraes, I. B.; Manzan-Martins, C.; de Gouveia, N. M.; Calábria, L. K.; Hiraki, K. R. N.; Moraes, A. d. S.; Espindola, F. S. Polyploidy analysis and attenuation of oxidative stress in hepatic tissue of STZ-induced diabetic rats treated with an aqueous extract of *Vochysia rufa*. *Evidence-Based Complement. Altern. Med.* 2015, 2015, 8.
- (9) Diaz-Flores, M.; Ibanez-Hernandez, M. A.; Galvan, R. E.; Gutierrez, M.; Duran-Reyes, G.; Medina-Navarro, R.; Pascoe-Lira, D.; Ortega-Camarillo, C.; Vilar-Rojas, C.; Cruz, M.; Baiza-Gutman, L. A. Glucose-6-phosphate dehydrogenase activity and NADPH/NADP⁺ ratio in liver and pancreas are dependent on the severity of hyperglycemia in rat. *Life Sci.* 2006, 78, 2601–2607.
- (10) Cumaoğlu, A.; Çevik, Ç.; Rakova, L.; Ari, N.; Karasu, Ç. Effects of antioxidant stabdown on protein carbonylation, advanced oxidation protein products and reductive capacity of liver in streptozotocin-diabetic rats: role of oxidative/nitrosative stress. *BioFactors* 2007, 30, 171–178.
- (11) Madar, Z.; Kalet-Litman, S.; Stark, A. H. Inducible nitric oxide synthase activity and expression in liver and hepatocytes of diabetic rats. *Pharmacology* 2005, 73, 106–112.
- (12) Vilar, J. B.; Ferreira, F. L.; Ferri, P. H.; Guilló, L. A.; Chen Chen, L. Assessment of the mutagenic, antimutagenic, and cytotoxic activities of ethanolic extract of araticum (*Annona crassiflora* Mart. 1841) by micronucleus test in mice. *Braz. J. Biol.* 2008, 68, 141–147.
- (13) Silva, J. J.; Cerdeira, C. D.; Chavasco, J. M.; Cintra, A. B.; Silva, C. B.; Mendonça, A. N.; Ishikawa, T.; Borriollo, M. F.; Chavasco, J. K. In vitro screening antibacterial activity of *Bidens pilosa* Linne and *Annona crassiflora* Mart. against oxacillin resistant *Staphylococcus aureus* (ORSA) from the aerial environment at the dental clinic. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* 2014, 56, 333–340.
- (14) Takahashi, J. A.; Pereira, C. R.; Pimenta, L. P.; Boaventura, M. A.; Silva, L. G. Antibacterial activity of eight Brazilian Annonaceae plants. *Nat. Prod. Res.* 2006, 20, 21–26.
- (15) Machado, A. R.; Ferreira, S. R.; da Silva Medeiros, F.; Fujiwara, R. T.; de Souza Filho, J. D.; Pimenta, L. P. Nematicidal activity of *Annona*

- crassiflora* leaf extract on *Caenorhabditis elegans*. *Parasites Vectors* 2015, 8, 113.
- (16) Pimenta, L. P.; Garcia, G. M.; Gonçalves, S. G.; Dionisio, B. L.; Braga, E. M.; Mosqueira, V. C. In vivo antimalarial efficacy of acetogenins, alkaloids and flavonoids enriched fractions from *Annona crassiflora* Mart. *Nat. Prod. Res.* 2014, 28, 1254–1259.
- (17) de Omêra, M. C.; Navarro, D. M.; de Paula, J. E.; Luna, J. S.; Ferreira de Lima, M. R.; Sant'Ana, A. E. Larvicidal activities against *Aedes aegypti* of some Brazilian medicinal plants. *Bioresour. Technol.* 2007, 98, 2549–2556.
- (18) dos Santos, A. F.; Sant'Ana, A. E. Molluscicidal properties of some species of *Annona*. *Phytomedicine* 2001, 8, 115–120.
- (19) Dragão, N. R.; de Venâncio, V. P.; Paula, F. B.; Della Lucia, F.; Fonseca, M. J.; Azevedo, L. Influence of marolo (*Annona crassiflora* Mart.) pulp intake on the modulation of mutagenic/antimutagenic processes and its action on oxidative stress in vivo. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2010, 65, 319–325.
- (20) Roessler, R.; Catharino, R. R.; Malta, L. G.; Eberlin, M. N.; Pastore, G. Antioxidant activity of *Annona crassiflora*: characterization of major components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* 2007, 104, 1048–1054.
- (21) Justino, A. B.; Pereira, M. N.; Vilela, D. D.; Peixoto, L. G.; Martins, M. M.; Teixeira, R. R.; Miranda, N. C.; da Silva, N. M.; de Sousa, R. M. F.; de Oliveira, A.; Espindola, F. S. Peel of aracum fruit (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of antioxidant compounds with α -amylase, α -glucosidase and glycation inhibitory activities. *Bioorg. Chem.* 2016, 69, 167–182.
- (22) Pereira, M. N.; Justino, A. B.; Martins, M. M.; Peixoto, L. G.; Vilela, D. D.; Santos, P. S.; Teixeira, T. L.; da Silva, C. V.; Goulart, L. R.; Pivatto, M.; Espindola, F. S. Stephalagine, an alkaloid with pancreatic lipase inhibitory activity isolated from the fruit peel of *Annona crassiflora* Mart. *Ind. Crops Prod.* 2017, 97, 324–329.
- (23) Praman, S.; Mulvany, M. J.; Allenbach, Y.; Marston, A.; Hostettmann, K.; Sitiruge, P.; Jansakul, C. Effects of an n-butanol extract from the stem of *Tinospora crispa* on blood pressure and heart rate in anesthetized rats. *J. Ethnopharmacol.* 2011, 133, 675–686.
- (24) Orhan, N.; Aslan, M.; Orhan, D. D.; Ergun, F.; Yesilada, E. In-vivo assessment of antidiabetic and antioxidant activities of grapevine leaves (*Vitis vinifera*) in diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 108, 280–286.
- (25) Luippold, G.; Benedito, J.; Voigt, A.; Grempler, R. Short- and long-term glycemic control of streptozotocin-induced diabetic rats using different insulin preparations. *PLoS One* 2016, 11, e0156346.
- (26) Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 1976, 72, 248–254.
- (27) Benzie, I. F.; Strain, J. J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of "antioxidant power": the FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239, 70–76.
- (28) Diniz Vilela, D.; Gomes Peixoto, L.; Teixeira, R. R.; Beleza Baptista, N.; Carvalho Caixeta, D.; Vieira de Souza, A.; Machado, H. L.; Pereira, M. N.; Sabino-Silva, R.; Espindola, F. S. The role of metformin in controlling oxidative stress in muscle of diabetic rats. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2016, 2016, 6978625.
- (29) Reznick, A. Z.; Packer, L. Oxidative damage to proteins: spectrophotometric method for carbonyl assay. *Methods Enzymol.* 1994, 233, 357–363.
- (30) Marklund, S.; Marklund, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *Eur. J. Biochem.* 1974, 47, 469–474.
- (31) Aebi, H. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 1984, 105, 121–126.
- (32) Pires, D. E. V.; Blundell, T. L.; Ascher, D. B. pkCSM: predicting small-molecule pharmacokinetic and toxicity properties using graph-based signatures. *J. Med. Chem.* 2015, 58, 4066–4072.
- (33) Gu, L.; House, S. E.; Wu, X.; Ou, B.; Prior, R. L. Procyanidin and catechin contents and antioxidant capacity of cocoa and chocolate products. *J. Agric. Food Chem.* 2006, 54, 4057–4061.
- (34) Ye, H. Y.; Li, Z. Y.; Zheng, Y.; Chen, Y.; Zhou, Z. H.; Jin, J. The attenuation of chlorogenic acid on oxidative stress for renal injury in streptozotocin-induced diabetic nephropathy rats. *Arch. Pharmacol. Res.* 2016, 39, 989–997.
- (35) Vinayagam, R.; Xu, B. Antidiabetic properties of dietary flavonoids: a cellular mechanism review. *Nutr. Metab.* 2015, 12, 60.
- (36) Rice-Evans, C.; Miller, N.; Paganga, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci.* 1997, 2, 152–159.
- (37) Dey, A.; Swaminathan, K. Hyperglycemia-induced mitochondrial alterations in liver. *Life Sci.* 2010, 87, 197–214.
- (38) Inoue, M.; Ohtake, T.; Motomura, W.; Takahashi, N.; Hosoki, Y.; Miyoshi, S.; Suzuki, Y.; Saito, H.; Kohgo, Y.; Okumura, T. Increased expression of PPAR γ in high fat diet-induced liver steatosis in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005, 336, 215–222.
- (39) Wolf, P. L. Clinical significance of an increased or decreased serum alkaline phosphatase level. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1978, 102, 497–501.
- (40) Rosalki, S. B. Gamma-glutamyl transpeptidase. *Adv. Clin. Chem.* 1975, 17, 53–107.
- (41) Briones, E. R.; Mao, S. J.; Palumbo, P. J.; O'Fallon, W. M.; Chenoweth, W.; Kottke, B. A. Analysis of plasma lipids and apolipoproteins in insulin-dependent and noninsulin-dependent diabetics. *Metab. Clin. Exp.* 1984, 33, 42–49.
- (42) Holmgren, P. R.; Brown, A. C. Serum cholesterol levels of nondiabetic and streptozotocin-diabetic rats fed a high cholesterol diet. *Arteria* 1993, 20, 337–345.
- (43) Lee, Y. A.; Kim, Y. J.; Cho, E. J.; Yokozawa, T. Ameliorative effects of proanthocyanidin on oxidative stress and inflammation in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Agric. Food Chem.* 2007, 55, 9395–9400.
- (44) Bandeira Sde, M.; Guedes Góis, S.; da Fonseca, L. J.; Pires, A. S.; Gelain, D. P.; Moreira, J. C.; Rabelo, L. A.; Vasconcelos, S. M.; Goulart, M. O. Characterization of blood oxidative stress in type 2 diabetes mellitus patients: increase in lipid peroxidation and SOD activity. *Oxid. Med. Cell. Longevity* 2012, 2012, 819310.
- (45) Dean, R. T.; Fu, S.; Stocker, R.; Davies, M. J. Biochemistry and pathology of radical-mediated protein oxidation. *Biochem. J.* 1997, 324, 1–18.
- (46) Jang, Y. Y.; Song, J. H.; Shin, Y. K.; Han, E. S.; Lee, C. S. Protective effect of boldine on oxidative mitochondrial damage in streptozotocin-induced diabetic rats. *Pharmacol. Res.* 2000, 42, 361–371.
- (47) Tabassum, H.; Parvez, S.; Rehman, H.; Banerjee, B. D.; Raisuddin, S. Catechin as an antioxidant in liver mitochondrial toxicity: inhibition of tamoxifen-induced protein oxidation and lipid peroxidation. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 2007, 21, 110–117.
- (48) Horie, S.; Ishii, H.; Suga, T. Changes in peroxisomal fatty acid oxidation in the diabetic rat liver. *J. Biochem.* 1981, 90, 1691–1696.
- (49) Dias, A. S.; Porawski, M.; Alonso, M.; Marroni, N.; Collado, P. S.; Gonzalez-Gallego, J. Quercetin decreases oxidative stress, NF- κ B activation, and iNOS overexpression in liver of streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr.* 2005, 135, 2299–2304.
- (50) Maritim, A. C.; Sanders, R. A.; Watkins, J. B., 3rd Effects of alpha-lipoic acid on biomarkers of oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Nutr. Biochem.* 2003, 14, 288–294.
- (51) Coskun, O.; Kanter, M.; Korkmaz, A.; Oter, S. Quercetin, a flavonoid antioxidant, prevents and protects streptozotocin-induced oxidative stress and beta-cell damage in rat pancreas. *Pharmacol. Res.* 2005, 51, 117–123.
- (52) Al-Numair, K. S.; Chandramohan, G.; Veeramani, C.; Alsaif, M. A. Ameliorative effect of kaempferol, a flavonoid, on oxidative stress in streptozotocin-induced diabetic rats. *Redox Rep.* 2015, 20, 198–209.
- (53) Prabhakar, S. S. Role of nitric oxide in diabetic nephropathy. *Semin. Nephrol.* 2004, 24, 333–44.
- (54) Chang, C. C.; Chang, C. Y.; Huang, J. P.; Hung, L. M. Effect of resveratrol on oxidative and inflammatory stress in liver and spleen of streptozotocin-induced type 1 diabetic rats. *Chin. J. Physiol.* 2012, 55, 192–201.
- (55) Kowluru, R. A.; Koppolu, P.; Chakrabarti, S.; Chen, S. Diabetes-induced activation of nuclear transcriptional factor in the retina, and its inhibition by antioxidants. *Free Radical Res.* 2003, 37, 1169–1180.

- (56) Olthof, M. R.; Hollman, P. C.; Katan, M. B. Chlorogenic acid and caffeoic acid are absorbed in humans. *J. Nutr.* 2001, **131**, 66–71.
- (57) Actis-Goretta, L.; Leveques, A.; Rein, M.; Teml, A.; Schafer, C.; Hofmann, U.; Li, H.; Schwab, M.; Eichelbaum, M.; Williamson, G. Intestinal absorption, metabolism, and excretion of (−)-epicatechin in healthy humans assessed by using an intestinal perfusion technique. *Am. J. Clin. Nutr.* 2013, **98**, 924–933.
- (58) Spencer, J. P.; Schroeter, H.; Shenoy, B.; Srai, S. K.; Debnam, E. S.; Rice-Evans, C. Epicatechin is the primary bioavailable form of the proanthocyanidin dimers B2 and B5 after transfer across the small intestine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001, **285**, 588–593.
- (59) Sundarrajan, S.; Arumugam, M. A systems pharmacology perspective to decipher the mechanism of action of Parangichalkai chooranam, a Siddha formulation for the treatment of psoriasis. *Biomed. Pharmacother.* 2017, **88**, 74–86.
- (60) Yamakoshi, J.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kikuchi, M. Safety evaluation of proanthocyanidin-rich extract from grape seeds. *Food Chem. Toxicol.* 2002, **40**, 599–607.
- (61) Nair, A. B.; Jacob, S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *J. Basic. Clin. Pharm.* 2016, **7**, 27–31.