

Universidade Federal de Uberlândia – UFU
Faculdade de Medicina Veterinária
Curso de Graduação em Medicina Veterinária

Atividade farmacológica anti-inflamatória do extrato aquoso de
***Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) DC**
em modelo experimental *in vivo*

VIVIANE ANDRADE APARECIDO

Uberlândia – MG

Novembro

VIVIANE ANDRADE APARECIDO

**Atividade farmacológica anti-inflamatória do extrato aquoso de
Eugenia dysenterica (Myrtaceae) DC
em modelo experimental *in vivo***

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

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

Uberlândia - MG

2018

VIVIANE ANDRADE APARECIDO

**Atividade farmacológica anti-inflamatória do extrato aquoso de
Eugenia dysenterica (Myrtaceae) DC em modelo experimental *in vivo***

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

Banca Examinadora:

PROFA. DRA. CELENE MARIA DE OLIVEIRA SIMÕES ALVES

PROFA. DRA. ROBERTA CAMPOS LINO

PROFA. Ms. MARINA ABADIA RAMOS

Uberlândia, 30 de novembro de 2018.

RESUMO

A *Eugenia dysenterica*, popularmente conhecida como cagaita, é uma espécie frutífera nativa do Cerrado brasileiro e pertencente à família Myrtaceae. Compostos fenólicos na referida espécie têm sido relacionados à ação antioxidante da cagaita. Contudo, não existem trabalhos que tenham avaliado o potencial anti-inflamatório da *E. dysenterica*. Assim, este estudo propôs-se a investigar os possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso das folhas de *E. dysenterica* em modelo experimental *in vivo*. O extrato aquoso foi preparado a partir das folhas secas e trituradas na proporção de 20% (m/v), seguido de congelamento e liofilização. Para a avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios, inicialmente, foi padronizado o método de edema de pata induzido por carragenina. Camundongos da linhagem BALB/c foram tratados por via oral com carboximetilcelulose 0,5% ou indometacina (10 mg/Kg). Após 60 minutos, os animais receberam injeção intraplantar de carragenina (30 µL a 0,5% ou 1,0%) na pata posterior direita e solução salina (NaCl 0,9%; 30 µL) na pata posterior esquerda (controle). A determinação do volume da pata foi feita em pletismômetro. As medidas do edema foram registradas antes da injeção da carragenina e após 0,25, 0,5, 1, 2, 4, e 6 horas. O edema foi expresso como o aumento do volume (mL) da pata tratada com CGN comparado à pata controle em cada intervalo de tempo. Em seguida, foi realizada a eutanásia por deslocamento cervical dos animais e as patas posteriores direita e esquerda foram seccionadas na articulação tibio-társica com lâmina de bisturi e colocadas em tubos falcon contendo formalina 10% para fixação. Posteriormente, foram seccionados os dedos e feito corte longitudinal para inclusão em parafina, coloração das lâminas e avaliação de infiltrado inflamatório no músculo plantar. Após a padronização, foram realizados os experimentos com as concentrações 100 mg/kg, 550 mg/kg e 1000 mg/kg do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* administrado por gavagem. Ao grupo controle positivo foi administrado, por via oral (v.o.), indometacina (10mg/kg); ao controle negativo foi administrado CBX 0,5%. Após sessenta minutos, os animais receberam injeção intraplantar de carragenina 0,5% na pata direita e NaCl 0,9% estéril na pata esquerda e o volume das patas foi medido em pletismomêtro antes da injeção de carragenina e após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas. A avaliação estatística dos dados obtidos demonstrou que o extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* não foi eficaz na redução do edema de pata induzido por carragenina nesse modelo experimental.

Palavras-Chave: Myrtaceae; carragenina; inflamação.

ABSTRACT

Eugenia dysenterica, popularly known as cagaita, is a fruit species native to the Brazilian Cerrado and belong to the Myrtaceae family. Phenolic compounds in this species have been related to the antioxidant action of cagaita. However, there are no studies evaluating the anti-inflammatory potential of *E. dysenterica*. Thus, this study proposed to investigate the possible anti-inflammatory effects of the aqueous extract of the leaves of *E. dysenterica* in experimental model in vivo. The aqueous extract was prepared from the dried and crushed leaves at a ratio of 20% (w/v), followed by freezing and lyophilization. For the evaluation of anti-inflammatory pharmacological effects, initially the carrageenan-induced paw edema method was standardized. BALB/c mice were orally treated with 0.5% carboxymethylcellulose or indomethacin (10 mg / kg). After 60 minutes, the animals received an injection inside the paw of carrageenan (30 μ L at 0.5% or 1.0%) in the right hind paw and saline solution (NaCl 0.9%, 30 μ L) in the left hind paw (control). Paw volume determination was performed on a plethysmometer. Measurements of edema were recorded before carrageenan injection and after 0.25, 0.5, 1, 2, 4, and 6 hours. Edema was expressed as the increase in volume (mL) of the paw treated with CGN compared to the control paw at each time interval. Euthanasia was then performed by cervical displacement of the animals and the right and left hind paws were sectioned at the tibio-tarsal joint with a scalpel blade and placed in falcon tubes containing 10% formalin for fixation. Afterwards, the fingers were sectioned and made longitudinal cut for inclusion in paraffin, staining of the blades and evaluation of inflammatory infiltrate in the plantar muscle. After the standardization, the experiments with the concentrations of 100 mg/kg, 550 mg/kg and 1000 mg/kg of *Eugenia dysenterica* aqueous extract administered by gavage were performed. The positive control group was administered orally, indomethacin (10mg / kg); negative control was administered 0.5% CBX. After sixty minutes, the animals received an injection in one of the hind paws of 0.5% carrageenan in the right paw and 0.9% NaCl in the left paw and the paw volume was measured in plethysmometer before the injection of carrageenan and after 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours. Statistical evaluation of the data obtained showed that the aqueous extract of *Eugenia dysenterica* was not effective in reducing paw edema induced by carrageenan in this experimental model.

Key words: Myrtaceae; carrageenan; paw edema.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	7
2 REVISÃO DE LITERATURA	8
2.1 <i>Eugenia dysenterica</i>	8
2.2 Compostos bioativos na espécie <i>Eugenia dysenterica</i>	9
3 JUSTIFICATIVA	11
4 OBJETIVOS	12
4.1 Objetivo Geral	12
4.2 Objetivos Específicos	12
5 METODOLOGIA	12
5.1 Condição ambiental	12
5.2 Material vegetal	12
5.3 Obtenção do extrato aquoso	13
5.4 Animais	13
5.5 Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios	14
5.5.1 Padronização de modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória em camundongos BALB/c: Edema de pata induzido por carragenina	14
5.5.2 Avaliação do efeito antiedematogênico de <i>E. dysenterica</i> em Edema de pata induzido por carragenina	16
5.6 Padronização dos cortes histológicos para análise morfológica e patológica.....	16
5.7 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais.....	18
5.8 Protocolo de eutanásia	18
5.9 Análise estatística	19
6 RESULTADOS	19
6.1 Padronização de modelo experimental para avaliação de atividade anti-inflamatória em camundongos BALB/c: edema de pata induzido por carragenina ...	19
6.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso de <i>E. dysenterica</i>	20
6.3 Padronização das preparações de tecido plantar (músculo plantar) para análise histopatológica	21
6.3.1 Análise histopatológica dos corte histológicos obtidos após a padronização das preparações de tecido plantar	22
6.4 Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais	23
7 DISCUSSÃO	24
8 CONCLUSÕES	27
9 PERSPECTIVAS FUTURAS	28

REFERÊNCIAS	28
ANEXOS I	33

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem uma opção de tratamento e manutenção das condições de saúde para um número expressivo de indivíduos, principalmente aqueles menos favorecidos (LIMA et al., 2013). O uso popular e empírico de diferentes preparações de espécies vegetais com fins terapêuticos é bastante antigo e a medicina moderna reconhece a sua importância na atenção primária, tendo em vista que 85% da população mundial utilizam plantas ou seus derivados nos cuidados básicos à saúde (POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS, 2006).

Atualmente, muitos estudos têm sido realizados para identificar e comprovar a presença de substâncias biológicas ativas em diferentes espécies vegetais. Vários estudos farmacológicos evidenciaram que frações e extratos de algumas espécies de plantas possuem propriedades antivirais, antiofídicas e anti-inflamatórias, constituindo uma alternativa para o tratamento de diversas enfermidades (ZAMUNER et al., 2012). Assim, extratos, óleos ou outros produtos derivados de plantas, bem como compostos isolados de produtos naturais vegetais são matéria-prima promissora para o desenvolvimento de novas drogas. O desenvolvimento de fitoterápicos com eficácia e segurança comprovadas representam uma estratégia para aumentar o acesso da população aos medicamentos e para oferecer mais opções de tratamento para diversas condições patológicas (SILVA et al., 2001; LIMA et al., 2013).

O Cerrado é o segundo maior bioma da América do Sul, ocupando cerca de 25% do território brasileiro, localizado na porção central do país (MENDONÇA et al, 2008). Dentre as espécies nativas do Cerrado brasileiro, encontramos a *Eugenia Dysenterica* DC, conhecida popularmente como Cagaita ou Cagaiteira. Estudos de análise fitoquímica sugerem a presença de polifenóis no extrato da folha da espécie *Eugenia dysenterica*, entre os quais estão presentes os flavonóides catequina, além de taninos condensados. Várias atividades biológicas são desempenhadas por compostos fenólicos, como os flavonóides, dentre elas estão as ações anti-inflamatória e antioxidante (MALHEIROS, MACHADO & MAPELI, 2014).

A inflamação ocorre devido a uma resposta do organismo contra invasão de patógenos e se caracteriza pela presença de dor, rubor, calor, edema e perda de função. Sendo ela associada a patogênese do câncer, disfunção cardiovascular, envelhecimento e outros distúrbios debilitantes e que oferecem risco à saúde. No geral, a inflamação é um processo de superprodução de radicais livres, ativação de enzimas complexas e liberação de mediadores inflamatórios e pró-inflamatórios. Sendo ela impedida, principalmente, através da inibição da síntese de eicosanóides (prostaciclina, prostaglandinas e tromboxanos) (RUSH & NICULESCU, 1997; CARUSO et al., 2004; FINCH, 2005; BRANDÃO, 2011).

Apesar de a literatura apresentar vários estudos sobre propriedades anti-inflamatórias de espécies do gênero *Eugenia*, no presente momento, ainda não existem dados que demonstrem atividades anti-inflamatórias para *E. dysenterica*. Uma vez que essa espécie contém flavonóides e taninos, substâncias para as quais têm sido descritas ações anti-inflamatórias, este estudo investigou possíveis efeitos anti-inflamatórios do extrato aquoso liofilizado das folhas de *E. dysenterica* em modelo experimental *in vivo*.

2 Revisão da literatura

2.1 *Eugenia dysenterica*

A Cagaita é uma espécie frutífera pertencente à família *Myrtaceae*, encontrada nos estados de Goiás, Minas Gerais, São Paulo, Tocantins e Bahia, apresentando-se como uma árvore com até 10 m de altura, tronco e ramos tortuosos, casca grossa e fissurada. Seus frutos têm formato globoso (3-5 cm de diâmetro) e cor amarelo-clara (SILVA et al., 2001; RIBEIRO, 2011). Na região central do Brasil, seu florescimento ocorre em agosto a setembro, iniciando-se junto com as primeiras chuvas e durando apenas uma semana. Concomitantemente, há novas brotações ricas em pigmentação vermelha (PROENÇA & GIBBS, 1994). Os processos de florescimento, produção de nova folhagem e frutificação ocorrem no período de um mês (RIBEIRO et al., 1994; SANO et al., 1995).

A *Eugenia dysenterica* possui um grande potencial produtivo com presença de muitas árvores com mais de 1.500 frutos na mesma safra, sendo que seu peso varia de 2,0 g a mais de 30 g, e seu diâmetro, de 2,0 cm a 3,0 cm (SANO et al., 1995). Seu caule é de madeira pesada, dura, de textura fina, densidade baixa e de má qualidade, sendo usado como mourão, carvão e lenha (CORRÊA, 1984). Além disso, sua casca pode ser usada na indústria de curtume, e é popularmente utilizada por possuir propriedade antidiarreica (MACEDO, 1991). Suas folhas possuem a mesma propriedade terapêutica apresentada pela casca, além de também serem usadas para o tratamento de icterícia, diabetes e doenças cardíacas (BRANDÃO, 1991; SILVA, 1999).

O gênero *Eugenia* compreende mais de 500 espécies. Estudos com extratos hidroetanólicos de folhas das espécies *E. aurata* e *E. puniceifolia* mostraram propriedades anti-inflamatórias por mecanismos que envolvem redução da adesão e da desgranulação de neutrófilos (COSTA et al., 2016). A presença dos compostos fenólicos na *E. dysenterica* tem sido relacionada à ação antioxidante da cagaita observada em estudos que avaliaram efeitos gastroprotetores utilizando-se o extrato aquoso de folhas da cagaita. (PRADO et al., 2014). Segundo Pietrovski et al. (2008), a *Eugenia brasiliensis*, outra espécie de planta pertencente à

família a Myrtaceae, apresenta atividade anti-inflamatória tópica, comprovada pelo uso do extrato hidroalcoólico, de frações e de componentes isolados (quercetina, catequina e catequina galato), os quais mostraram capacidade de reduzir significativamente o edema de orelha induzido por cróton em camundongos. A análise histológica mostrou a inibição do influxo de células polimorfonucleares. Além dessas atividades biológicas, estudo demonstrou atividade antifúngica contra o *Cryptococcus neoformans* no óleo hidrolisado das folhas de *E. dysenterica* (COSTA et al., 2000).

Além de todas as funções atribuídas à *Eugenia dysenterica*, experimentos realizados recentemente com o óleo essencial extraído das folhas dessa espécie, por Galheigo et al. (2015), mostram que houve a inibição da diarreia induzida pelo óleo de mamona, mas a farinha de carvão administrada percorreu a mesma distância no intestino e quando usada loperamida (fármaco antidiarreico) ela foi reduzida, sugerindo que a ação antidiarreica é relacionada ao aumento da absorção intestinal e/ou inibição da secreção intestinal. Comprovando que a planta promove a inibição da diarreia, ação pela qual já era popularmente conhecida por possuir.

2.2 Compostos bioativos na espécie *Eugenia dysenterica*

A espécie *E. dysenterica*, em geral, é fonte de vitamina C, apresenta alto nível de umidade, fibra alimentar e compostos fenólicos, sendo estes últimos os principais encarregados da sua ação antioxidante. (CARDOSO et al., 2011; ROCHA et al., 2011; PEREIRA et al., 2012). Suas folhas possuem quercetina, flavonoides e catequinas, sendo reportado o isolamento destes dois últimos compostos secundários recentemente (GASCA et al., 2017).

Os compostos fenólicos na *E. dysenterica* têm sido associados à sua capacidade protetora contra patógenos e insetos. Em relação aos alimentos, esses compostos estão correlacionados à textura, sabor, coloração, nutrição e conferindo, juntamente com outras substâncias, a ação antioxidante dos vegetais. Também são importantes para a pigmentação de flores, e a associação com hormônios inibe ou estimula a floração. Difundidos em vários vegetais, os compostos fenólicos são metabólitos secundários e têm como composição um anel aromático ligado a grupos funcionais e com um ou mais substituintes hidroxílicos. (LADEIRA et al., 1987; SIQUEIRA et al., 1991; SOARES et al., 2008; EVERETTE et al., 2010).

A atividade biológica dos flavonoides presentes nas folhas e caule de *E. dysenterica* foi estudada em linhagens de células leucêmicas e foram descobertos quatro novos compostos bioativos: ácido 3-acetil-olean-12-en-28-oico, isoquercetina, 3-hidroxi-4-metoxibenzoato de metilo e quercetina-3-O- (6''-O-galoil) - β -d-glucopiranosídeo. Este último composto apresentou efeito citotóxico contra CCRF-CEM (leucemia de célula T aguda) e Kasumi-1 (leucemia

mieloide aguda), indicando o potencial uso do flavonóide O-galoil como fármaco antileucêmico (VITEK et al., 2016).

Polifénóis dietéticos aparentam ter ação anti-inflamatória e antioxidante em doenças associadas a obesidade (WANG et al., 2014). Assim, foram realizados experimentos com o extrato rico em polifenóis extraído da cagaita e administrado por via oral a ratos previamente obesos. Observou-se um aumento da homeostasia da glicose e atenuação da dislipidemia, sem haver alteração no peso dos animais e no tecido adiposo. Os efeitos benéficos promovidos pelo extrato parecem estar associados, em parte, a redução da inflamação hepática e possui potencial para prevenção e tratamento da obesidade (DONADO-PESTANA et al., 2018).

Estudos *in vitro* sugerem que atividades anti-inflamatórias dos flavonoides estão associadas à inativação de enzimas pró-inflamatórias como a 5-lipoxigenase, óxido nítrico (NO) sintase e ciclooxygenase-2, responsáveis pela síntese de leucotrienos, NO e prostaglandinas, respectivamente. (FUNK, 2001; BEHLING, et al., 2004; SERAFINI et al., 2010).

Além dos flavonoides, a espécie *E. dysenterica* também contém taninos. Os taninos possuem um alto peso molecular e são divididos em dois grupos de acordo com sua estrutura: taninos condensados e taninos hidrolisáveis. Os taninos são caracterizados pela sua capacidade de precipitação de proteínas, como aquelas encontradas na saliva, elucidando sua importância na defesa da planta contra pragas, microrganismos patogênicos e animais que as utilizam como alimento (EFRAIM et al., 2006).

Na natureza, há a presença de diversos compostos fenólicos, diferindo de acordo com a sua composição química, mas compartilhando da mesma ação antioxidante. Assim, diferentes métodos podem ser empregados para sua extração da planta e quantificação (EFRAIM et al., 2006). Um dos métodos utilizados é o de Folin-Ciocalteu, com o objetivo de verificar todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos e resultando na mensuração da capacidade antioxidante total. Faz-se essa generalização, pois o reagente desse método interage também com compostos não fenólicos (EVERETTE et al., 2010). Em trabalho realizado por Takao et al. (2015), foi avaliado o conteúdo fenólico total (TPC) de espécies pertencentes à família Myrtaceae, incluindo a *Eugenia dysenterica*, e a correlação com o índice de atividade antioxidante (AAI), o qual quantifica o potencial antioxidante, pelo método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). Os resultados indicaram alta correlação entre TPC e AAI, com destaque para a espécie *P. laruotteanum*. Outro método é o de Vanilina, no qual se identifica a presença de taninos condensados e catequinas, através da reação destes com a vanilina em meio com HCL, resultando em um precipitado vermelho, observado

espectrofotometricamente. Além dessas substâncias, o método de Vanilina também detecta flavonoides monoméricos e poliméricos. (AGOSTINI-COSTA et al., 2003).

3 JUSTIFICATIVA

Considerando que as plantas medicinais representam uma opção terapêutica de grande importância para a manutenção das condições de saúde das pessoas, especialmente pela descoberta de novos compostos bioativos, pesquisas científicas e divulgação de propriedades terapêuticas de determinadas plantas medicinais contribuem fortemente para validar ou não o uso popular dessas plantas e contribuem para a descoberta de novas drogas de origem vegetal com potencial uso farmacológico / terapêutico.

Eugenia dysenterica é uma planta medicinal, conhecida popularmente como “cagaita”, com propriedades farmacológicas gastroprotetoras, as quais têm sido atribuídas à presença de substâncias polifenóis, flavonoides e taninos. Uma vez que estudos têm demonstrado que estas substâncias possuem atividades anti-inflamatórias e que as mesmas foram identificadas em espécies da mesma família, justifica-se investigar o possível papel da *E. dysenterica* no controle de processos inflamatórios.

Desta maneira, este estudo tem potencial para fornecer subsídios para a utilização de *E. dysenterica*, tradicional planta medicinal do Cerrado brasileiro, na produção de novos medicamentos úteis no tratamento de doenças inflamatórias.

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

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral:

A finalidade deste estudo foi investigar possível atividade anti-inflamatória no extrato aquoso obtido das folhas da espécie *Eugenia dysenterica* utilizando modelo experimental *in vivo*.

4.2 Objetivos Específicos:

- Preparar extrato aquoso de *Eugenia dysenterica*.
- Avaliar ação antiedematogênica sobre edema de pata induzido por carragenina.
- Realizar análise histopatológica do músculo plantar.
- Quantificar a enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais.

5 METODOLOGIA

5.1 Condição ambiental

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

5.2 Material vegetal

Uma amostra da espécie *Eugenia dysenterica* (**Figura 1**) foi coletada em campo de vegetação espontânea e, em seguida, identificada por biólogo qualificado. Em seguida uma exsicata (amostra prensada e dessecada) foi depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia (No de Registro: HUFU-45956). Posteriormente, as folhas da *Eugenia dysenterica* foram coletadas e utilizadas para a preparação do extrato aquoso.



Figura 1: *Eugenia dysenterical* Cagaiteira (fonte: Canabrava, H. A. N., 2017). Origem: Fazenda Pasto Velho, Lassance, MG. Latitude mínima: 0° 0' 0" S; Longitude mínima: 0° 0' 0" W. Árvore com, aproximadamente, 2,5 m de altura e com frutos imaturos no momento da coleta da exsicata.

5.3 Obtenção do extrato aquoso

Para obtenção do extrato aquoso, as folhas foram isoladas dos galhos e lavadas em água corrente e, em seguida, água destilada. Após a lavagem, as folhas foram colocadas em estufa a 45 °C por dois dias para secagem completa. Em seguida, foram trituradas em liquidificador, tamisadas e, para realizar a extração, colocadas em provetas contendo água destilada a 20% (m/v) por 48 horas à temperatura ambiente. Posteriormente, o extrato foi filtrado duas vezes, primeiro em funil com algodão e, em seguida, em funil contendo papel de filtro. O extrato obtido foi colocado em tubos falcon de 50 mL e mantido à temperatura -20° C. Após o congelamento, os extratos foram liofilizados (processo de desidratação) a -40 °C até a total remoção do conteúdo de água e o material adquirido foi pesado e acondicionado em freezer a - 20 °C até a utilização.

5.4 Animais

A pesquisa foi realizada com camundongos da linhagem BALB/c machos, com 20 a 30 gramas, fornecidos e mantidos no Centro de Bioterismo e Experimentação Animal (CBEA) da Universidade Federal de Uberlândia. Os animais foram mantidos em condições padrões, com temperatura do ambiente controlada a 25 °C e ciclos de 12 horas de luz e 12 horas de escuro, com água e ração *ad libitum*.

A administração de fármacos, veículos ou extrato aquoso de *E. dysenterica* aos animais foi realizada por via oral, por meio de cânula de gavagem específica para camundongos

(Figuras 2 e 3), a qual foi introduzida na boca do animal e gentilmente conduzida até o estômago. O volume total administrado foi 1,0 mL / 100 g animal.

Este projeto de pesquisa foi submetido à avaliação pela CEUA (Comissão de Ética no Uso de Animais) da Universidade Federal de Uberlândia, que regulamenta a pesquisa envolvendo animais e foi APROVADO (PROTOCOLO No 005/18 – ANEXO I).



Figura 2: Gavagem em camundongos Balb/c. Fonte: o autor (2018)

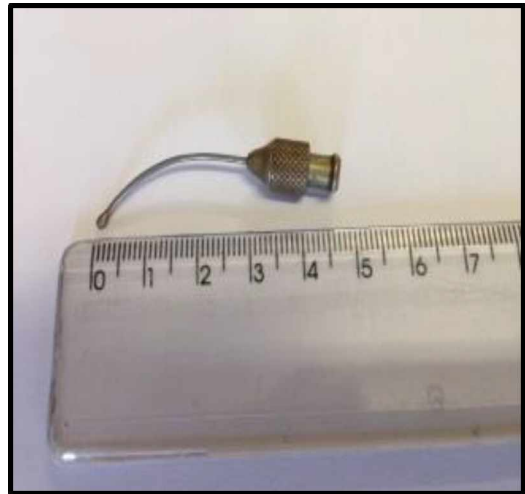


Figura 3: Cânula de gavagem específica para camundongos Balb/c. Fonte: o autor (2017)

5.5 Avaliação dos efeitos farmacológicos anti-inflamatórios

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

Este modelo foi utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *E. dysenterica* em camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina (CGN) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Inicialmente, foi padronizada a concentração de CGN para indução do edema de pata. Foram avaliadas as concentrações 0,5 e 1,0% de CGN preparada em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. Além da concentração, também foi avaliado o tempo para desenvolvimento do edema de pata após a administração intraplantar de CGN. Nesta etapa de padronização, os grupos controles positivo e negativo para efeito anti-inflamatório foram, respectivamente: animais tratados por via oral com o anti-inflamatório não – esteroide indometacina (10 mg/Kg solubilizado em carboximetilcelulose (CBX; 0,5%); 1,0 mL/ 100 g animal) e animais tratados somente com CBX 0,5%; 1,0 mL/ 100 g animal). Assim, os animais utilizados no ensaio de padronização foram divididos nos seguintes grupos: Grupo 1A (n = 3): animais tratados por via

oral (v.o.) com solução de carboximetilcelulose 0,5% (1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório); Grupo 1B (n = 3): animais tratados por via oral (v.o.) com solução de carboximetilcelulose 0,5% (1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle negativo para efeito anti-inflamatório); Grupo 2A (n = 3): animais tratados por via oral (v.o.) com indometacina preparada em solução de carboximetilcelulose 0,5% (10 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle positivo para efeito anti-inflamatório); Grupo 2B (n = 3): animais tratados por via oral (v.o.) com indometacina preparada em solução de carboximetilcelulose 0,5% (10 mg/Kg; 1,0 mL/ 100 g animal) (grupo controle positivo para efeito anti-inflamatório). Uma hora antes os tratamentos por via oral, os animais foram submetidos a jejum alimentar e hídrico. Sessenta minutos após os tratamentos por via oral, os grupos 1A e 2A receberam injeção intraplantar de carragenina a 1,0% na pata posterior direita, enquanto os grupos 1B e 2B receberam injeção de CGN 0,5%. Como controle negativo do efeito induzido pela injeção de carragenina, foi administrado igual volume de solução salina estéril (NaCl 0,9%) na pata posterior esquerda em todos os grupos experimentais (ALBERTINI et al., 2004; LIMA et al., 2013). As injeções intraplantares foram realizadas utilizando-se seringas para insulina (0,3 mL) e agulhas ultra-finas (BD ultra-fine II, 8 mm de comprimento, 0,3 mm de calibre). O volume das patas, medido até a articulação tíbio-társica, foi determinado antes e após 0, 25, 0,5, 1, 2, 4 e 6 horas a injeção da carragenina, com o auxílio de um pletismômetro (**Figura 4**) (VAN ARMAN et al, 1965). O edema foi expresso como o aumento do volume (mL; valores absolutos) da pata tratada com CGN (pata direita) comparado à pata controle negativo esquerda), em cada intervalo de tempo.

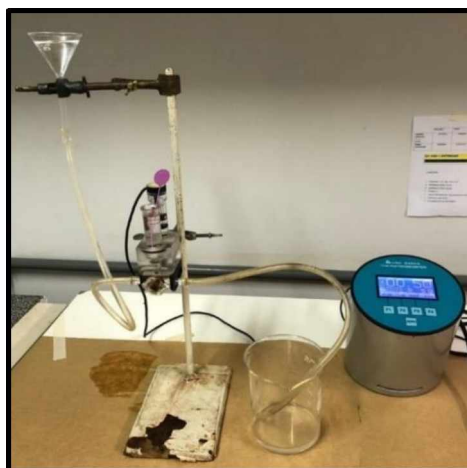


Figura 4: Pletismômetro.

5.5.2 Avaliação do efeito antiedematogênico de *E. dysenterica* em Edema de pata induzido por carragenina

Neste procedimento foram utilizados grupos experimentais com até 4 animais ($n = 4$). Diferentes concentrações de extrato aquoso de *Eugenia dysenterica* (100, 550, 1000 mg/Kg) preparadas em água destilada foram administradas por via oral (v.o.) sessenta minutos antes da injeção intraplantar de CGN na pata posterior direita do animal. O grupo controle positivo para o efeito anti-inflamatório foi tratado com indometacina (10 mg/kg, solubilizada em CBX 0,5%; v.o.; 1 mL/100 g animal), enquanto o grupo controle negativo para o efeito anti-inflamatório foi tratado com solução de CBX 0,5% (1 mL/100 g animal; v.o). Como os veículos para solubilização do extrato (veículo: água destilada) e da indometacina (veículo: CBX 0,5%) foram diferentes, aqueles animais tratados com indometacina também receberam igual volume de água (veículo do extrato), enquanto os animais tratados com extrato, receberam igual volume de CBX, e o grupo controle negativo recebeu igual volume de água. Para indução do edema de pata foi realizada injeção intraplantar de 30 μ L de CGN (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) a 0,5% (30 μ L correspondem a 150 μ g de CGN; 5 mg CGN diluída em 1ml de solução salina 0,9% estéril) na pata posterior direita; como controle negativo do efeito induzido pela injeção de carragenina, na pata contralateral foi administrado igual volume de solução salina estéril (veículo). As injeções intraplantares foram realizadas utilizando-se seringas para insulina (0,3 mL ou 0,5 mL) e agulhas ultra-finas (BD ultra-fine II, 8 mm de comprimento, 0,3 mm de calibre). O volume das patas, medido até a articulação tíbio-társica, foi determinado antes (volume basal) e após 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas a injeção da carragenina, com o auxílio de um pletismômetro. O edema foi expresso como o aumento do volume (mL) da pata tratada com CGN comparado à pata controle negativo (volume basal), em cada intervalo de tempo.

5.6 Padronização dos cortes histológicos para análise morfológica e patológica

Após a última medida do edema podal, os animais foram mortos por deslocamento cervical. Em seguida, as patas posteriores direita e esquerda foram seccionadas com lâmina de bisturi e colocadas em tubos falcon contendo formalina 10% (formaldeído 37% de pureza diluído em água destilada) e mantidas à temperatura ambiente por, no mínimo, 12 horas, para a fixação. Após essa fixação prévia, foram utilizadas para posterior processamento: (A) as patas completas (pata com coxim e dedos); (B) somente o coxim, obtido a partir de corte nas patas fixadas; (C) somente o coxim em corte longitudinal (dividido em duas partes). Em momento posterior, o coxim completo (D) e o coxim em corte longitudinal (E) foram submetidos a procedimento para desmineralização com ácido fórmico a 10% durante 48 horas, antes do

processamento para obtenção dos cortes histológicos. As amostras (A – E) foram processadas para posterior inclusão em parafina e preparação dos cortes histológicos, seguindo-se a sequência: (1) as patas foram colocadas em cassetes próprios e identificados; (2) desidratação em concentrações crescentes de álcoois (I) álcool 70% overnight, e, posteriormente a (II) 85%, (III) 95%, (IV) Absoluto I, (V) Absoluto II e, por fim, (VI) Absoluto III durante 30 minutos cada, sendo o álcool absoluto correspondente a 99% de pureza; (3) para a diafanização, utilizou-se três banhos de Xilol (Xilol 1, Xilol 2 e Xilol 3) também de duração de 30 minutos cada, para permitir melhor penetração de parafina na peça. Em seguida (4), as amostras foram colocadas em recipientes contendo parafina líquida a 60 °C e mantidas em estufa, num total de três banhos de parafina, cada um com duração de 30 minutos. Na inclusão propriamente dita (5), verteu-se a parafina com as amostras com a face plantar voltada para baixo em uma forma metálica para a formação dos blocos e esse material foi mantido por 12 horas à temperatura ambiente. Após a inclusão em parafina, (6) os blocos foram utilizados para a obtenção dos cortes histológicos em aparelho denominado micrótomo. Os cortes histológicos foram feitos com espessura de cinco micrômetros (μm) e, imediatamente, foram distendidos em água aquecida em banho-maria a 56°C, em um aparelho aquecedor com termostato, para evitar microdobras nos cortes. Após a distensão, os cortes foram colocados sobre lâminas de vidro, as quais foram colocadas em estufa por duas horas e, em seguida, coradas com a técnica hematoxilina/eosina. Para a coloração, os cortes parafinizados e colocados sobre as lâminas de vidro foram: (1) desparafinizados em xilol III, II e I durante 15 minutos cada; (2) hidratados em álcool (imersão em álcool absoluto III por 1 minuto; imersão em álcool absoluto II por 1 minuto; imersão em álcool absoluto I por 1 minuto; imersão em álcool 95% por 1 minuto; imersão em álcool 85% por 1 minuto; imersão em álcool 70% por 1 minuto); em seguida, as lâminas foram (3) lavadas em água corrente durante 10 minutos; (4) lavadas em água destilada durante 5 minutos; (5) coradas pela hematoxilina de Harris (corante básico) filtrada por 50 segundos; (6) lavadas em água corrente durante 10 minutos; (7) lavadas em água destilada durante 5 minutos; (8) coradas pela Eosina-floxina (corante ácido) por 1,5 minutos a 2 minutos; (9) lavadas em água corrente para retirar o excesso de corante (as lâminas foram mergulhadas 4 vezes em água corrente). Em seguida, os cortes foram (10) desidratados em álcool (imersão em álcool 70%; imersão em álcool 85%; imersão em álcool 95%; álcool absoluto I; álcool absoluto II; álcool absoluto III; as lâminas foram mergulhadas 10 vezes em cada reagente); (11) diafanizados em xilol I, II e III durante 10 minutos cada; e, por fim, as lâminas foi feita a (12) montagem das lâminas colocando-se uma gota de resina sintética sobre uma lamínula de vidro (24 mm x 60 mm), e esta é, então, colocada e comprimida sobre o corte de modo a espalhar-se a resina em fina

camada entre a lâmina e a lamínula. Após a montagem, (13) as lâminas foram colocadas em estufa para secagem a 37 °C por 48 horas (a secagem tem a finalidade secar a resina fixando a lamínula sobre a lâmina de vidro (esta etapa pode ser feita em estufa a 37° C ou à temperatura ambiente). As lâminas contendo os cortes foram avaliadas em microscópio de luz para avaliação da qualidade dos cortes e coloração, considerando os diferentes tipos de material utilizado (cortes A – E).

5.7 Avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais.

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

5.8 Protocolo de eutanásia

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

5.9 Análise Estatística

Para todos os cálculos estatísticos e confecção dos gráficos foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software, Inc., San Diego, EUA). Os dados foram expressos como a média \pm S.E.M (erro padrão da média). A comparação dos dados obtidos foi analisada por testes paramétricos, após a verificação pelo teste de normalidade de Kolmogorov-Smirnov que as variáveis exibiam distribuição normal. Foram utilizados o teste t de Student ou ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni quando apropriado. Todos os resultados foram considerados significativos para um nível de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

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

Os resultados obtidos estão representados na **Figura 5** e mostram que (1) o edema de pata em camundongos Balb/c foi induzido em ambas as concentrações de carragenina (0,5 e 1,0 % em NaCl) utilizadas; (2) o edema de pata induzido por carragenina (0,5 e 1,0 %) foi mais evidente após 4 e 6 horas a injeção intraplantar de CGN; (3) o anti-inflamatório não-esteroidal indometacina foi eficaz na redução do edema de pata após 4 e 6 horas a injeção intraplantar de carragenina, em ambas as concentrações utilizadas (CGN 0,5 e CGN 1,0 %). Considerando os resultados obtidos no ensaio de padronização, padronizou-se a utilização de carragenina 0,5% para a avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso de *E. dysenterica*.

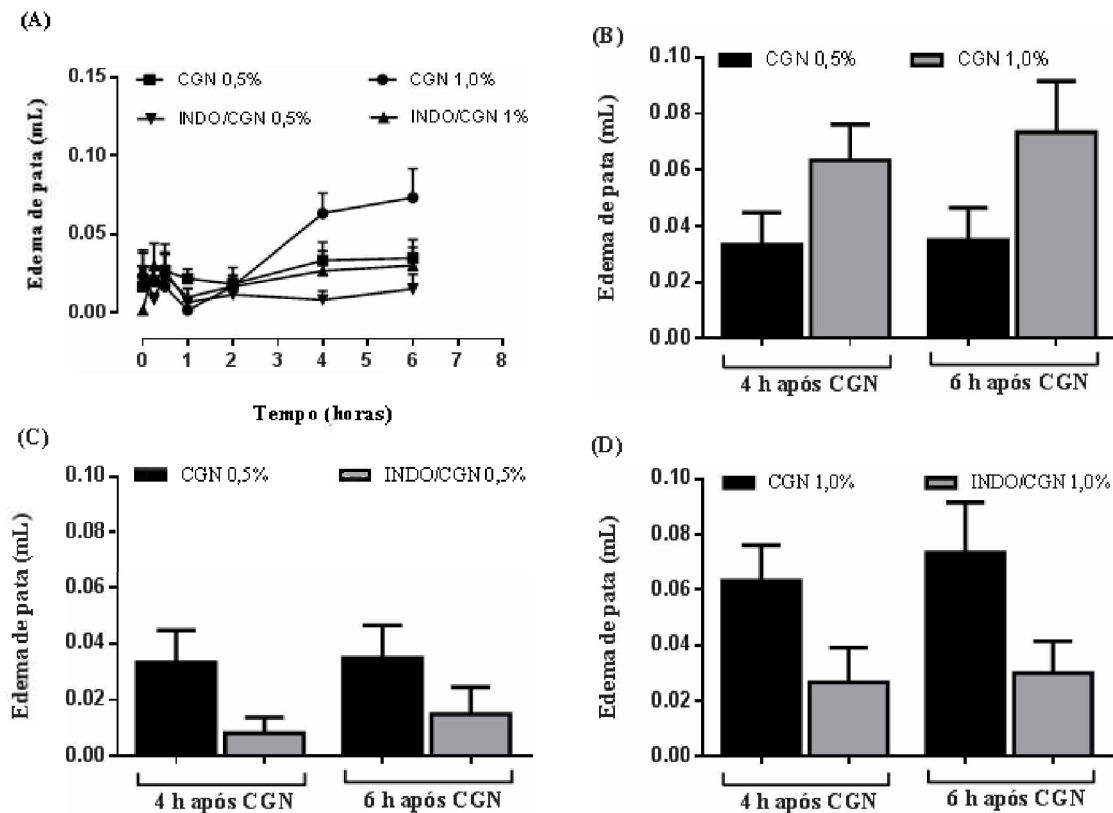


Figura 5: Padronização do método de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c. (A) Avaliação tempo-dependente do edema de pata em animais tratados por via oral com: indometacina (INDO; 10 mg/Kg; veículo: carboximetilcelulose; controle positivo) ou apenas carboximetilcelulose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

6.2 Efeito antiedematogênico do extrato aquoso da *E. dysenterica*

A **Figura 6** mostra os resultados obtidos na avaliação tempo-dependente do efeito antiedematogênico do extrato aquoso da *E. dysenterica* em camundongos BALB/c com edema de pata induzido por carragenina 0,5%. O edema de pata foi reduzido em animais tratados com indometacina (**Figura 6 A**), entretanto, o tratamento dos animais com o extrato aquoso de *E. dysenterica* (ED), em todas as concentrações utilizadas (100, 550, 1000 mg/kg), não foi eficaz na redução do edema de pata nesse modelo experimental (**Figuras 6 B - D**).

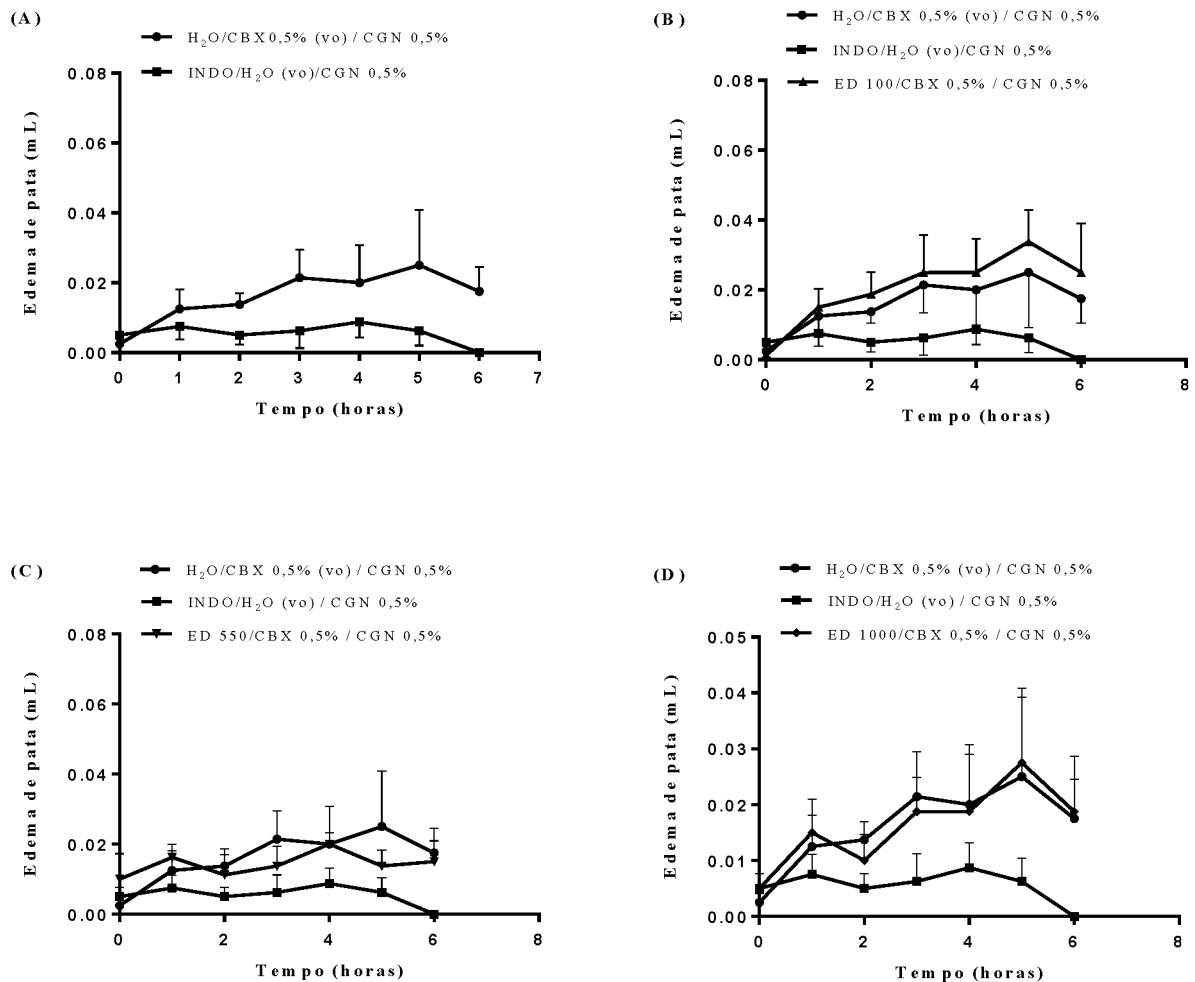


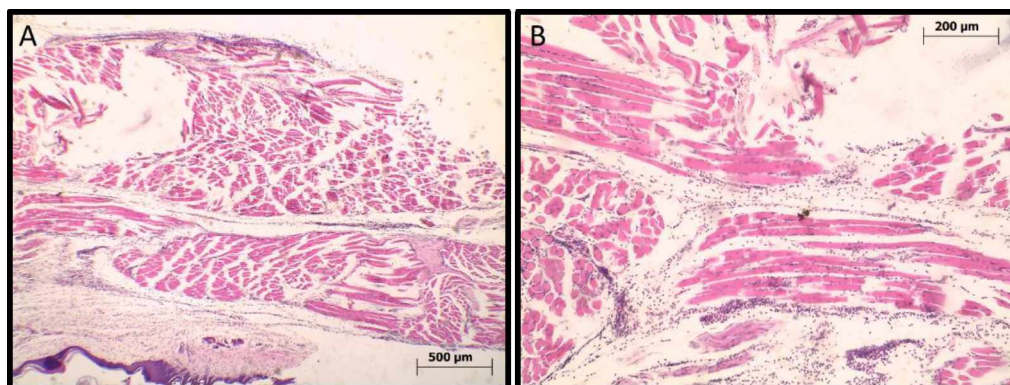
Figura 6: Avaliação do efeito anti edematogênico do extrato aquoso de *E. dysenterica* em modelo de edema de pata induzido por carragenina (CGN) em camundongos da linhagem BALB/c. (A) Avaliação tempo-dependente do edema de pata em animais tratados por via oral com: indometacina (INDO; 10 mg/Kg; veículo: carboximetilcelulose 0,5% (CBX)) e água destilada (controle positivo); ou apenas CBX e água destilada (controle negativo); e, após 1 hora, tratados com CGN 0,5% por via intraplantar. (B – D) Avaliação do efeito anti edematogênico do extrato aquoso de *E. dysenterica* em edema induzido por administração intraplantar de CGN 0,5%, em animais tratados por via oral apenas com CBX e água; ou indometacina e água; ou extrato da *E. dysenterica* (ED; 100 mg/Kg; 550 mg/Kg; 1000 mg/Kg) e CBX. Dados representativos de oito observações independentes ($n = 8$) e expressos como média \pm SEM. Significância estatística entre os grupos experimentais: $p > 0,05$ (ANOVA seguido do teste de comparação múltipla de Bonferroni).

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

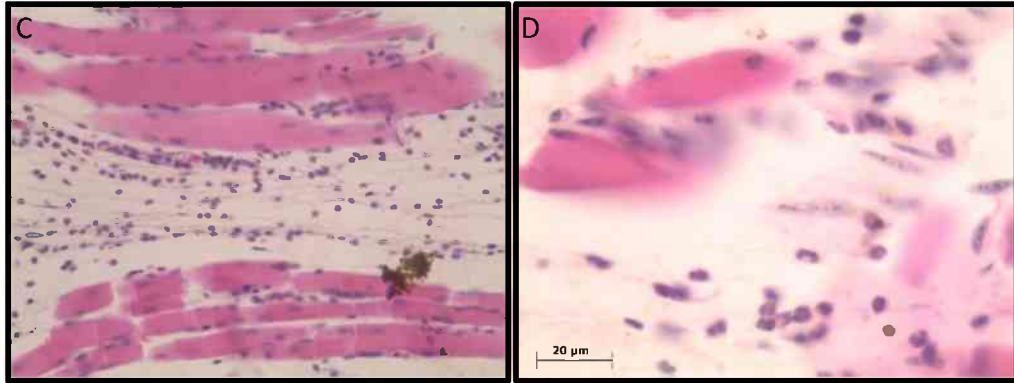
A utilização da pata completa (A) para a análise histopatológica tornou-se inviável, visto que, na tentativa de realizar os cortes histológicos, a presença do osso ainda mineralizado

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

6.3.1 Análise histopatológica dos cortes histológicos obtidos após a padronização das preparações de tecido plantar



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



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

6.4 Dosagem da enzima mieloperoxidase (MPO) em amostras teciduais

No grupo controle negativo, tratado com carboximetilcelulose (0,5%), foi detectada maior atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), comparada aos demais grupos experimentais, incluindo o grupo controle tratado com indometacina. Nos grupos de animais tratados com extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* nas concentrações de 100 e 550 mg/kg houve menor atividade MPO, semelhantes àquela atividade observada no grupo controle positivo. Nas amostras teciduais de animais tratados com a maior concentração do extrato (1000 mg/kg), houve maior atividade MPO, semelhante ao grupo controle negativo.

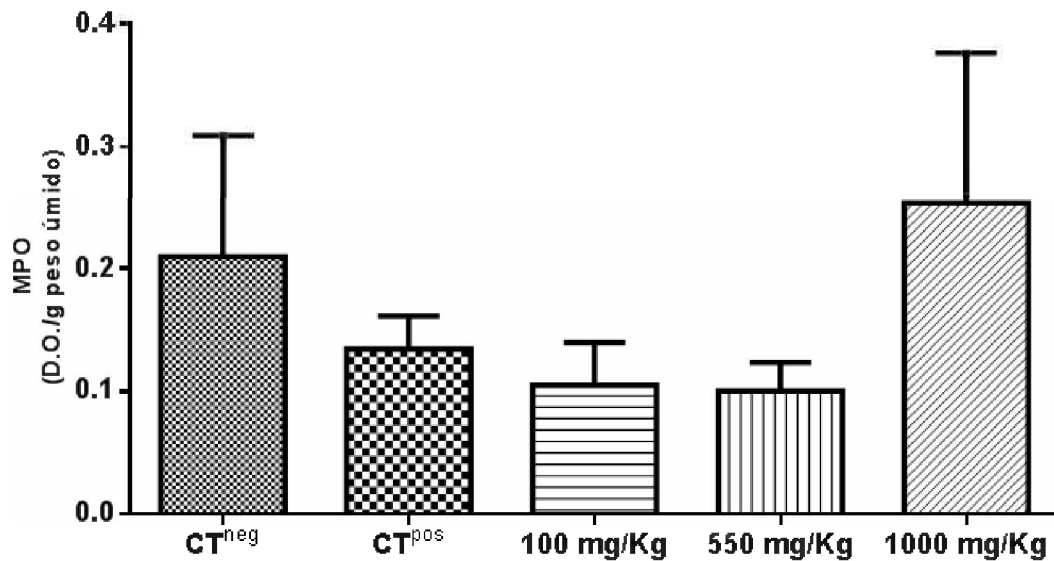


Figura 7: Dosagem de mieloperoxidase (MPO) (D.O./g peso úmido) em amostras teciduais de animais tratados por via oral com carboximetilcelulose (0,5%; grupo controle negativo - CT^{neg}); indometacina (10 mg/kg; grupo controle positivo CT^{pos}); extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* (concentrações 100, 550 e 1000 mg/kg), e, após 60 minutos, tratados com injeção intraplantar de carragenina 0,5%.

7 DISCUSSÃO

Compostos bioativos, como flavonoides, têm sido detectados em diferentes preparações de extratos derivados das espécies do gênero *Eugenia* e estão associados a ações anti-inflamatórias relacionadas a espécies vegetais diversas, inibindo a inflamação através da inativação de enzimas pró-inflamatórias como: óxido nítrico sintase, 5-lipoxigenase e ciclooxigenase-2 que sintetizam óxido nítrico, leucotrienos e prostaglandinas, respectivamente. (FUNK, 2001; BEHLING et al., 2004; PIETROVSKI et al., 2008; SERAFINI et al., 2010; COSTA et al., 2016).

A presença de flavonoides, além de taninos, na *Eugenia dysenterica* torna possível a presença de ação anti-inflamatória associada às folhas da planta, pois são substâncias que possuem essa propriedade, mas não há relatos na literatura do uso do extrato aquoso obtido através das folhas da espécie *E. dysenterica* para esse propósito farmacológico (EFRAIM et al., 2006; GASCA et al., 2017).

Um dos métodos para investigação da presença de atividade anti-inflamatória é o edema de pata induzido por carragenina, o qual é um modelo experimental já bem estabelecido na literatura. Estudos realizados com extrato metanólico de *Annona crassiflora* também investigaram potencial efeito anti-

inflamatório para a referida espécie utilizando o modelo experimental de edema de pata induzido por carragenina (ROCHA et al., 2015).

A carragenina é um elemento extraído das células de algas marinhas vermelhas, composta por hidratados de carbono de cadeia longa e possui ação irritante. Ela induz a inflamação de forma bifásica: sendo a fase inicial, na primeira hora após sua aplicação, mediada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina; e a segunda fase, a partir de duas horas da sua aplicação, mediada pela alta produção de prostaglandinas e infiltrado polimorfonuclear de leucócitos (neutrófilos, eosinófilos e basófilos). Na fase de atuação tardia da carragenina também há liberação de radicais livres derivados neutrófilos, óxido nítrico (NO) e citocinas pró-inflamatórias (fator de necrose tumoral e interleucina-1 β) os quais induzem a inflamação aguda. (VINEGAR, SCHREIBER & HUGO, 1969; DI ROSA, 1972; SALVEMINI et al., 1996; HALICI et al., 2007).

Ao causar uma lesão local aonde foi aplicada, inicia uma reação em cadeia nos vasos sanguíneos: dilatação de vasos da microcirculação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento de líquido plasmático e formação de edema, diapedese de células para o meio extracelular, fagocitose, aumento da viscosidade sanguínea e diminuição do fluxo sanguíneo. Essas reações são provocadas pelos mediadores químicos da inflamação, dentre os quais destacam-se: **(1)** aminas vasoativas (histamina e serotonina) presentes em grânulos citoplasmáticos de mastócitos, basófilos e plaquetas e induzem aumento da permeabilidade e vasodilatação; **(2)** proteases plasmáticas (sistema complemento (anafiltaxinas C3a e C5a) e cininas plasmáticas), responsáveis por aumento de permeabilidade vascular e vasodilatação, sendo que as cininas, juntamente com o sistema de coagulação, também irá induzir a formação do coágulo; **(3)** metabólitos do ácido araquidônico, como PGI₂ e PGE que provocam vasodilatação e tromboxano A₂ que produz vasoconstrição; **(4)** constituintes lisossômicos presentes em grânulos azurófilos de neutrófilos e aumentam a permeabilidade vascular; **(5)** radicais livres de oxigênio que provocam aumento da permeabilidade vascular; **(6)** fator ativador de plaquetas que estimula síntese de prostaglandinas e leucotrienos e em concentrações baixas causa aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, mas em níveis normais leva à vasoconstrição; **(7)** citocinas (interleucina 1, TNF) que estimulam a síntese de PGI₂, potente vasodilatador. A evolução da inflamação para um processo agudo ou crônico é determinada pelo tipo de estímulo que a iniciou e qual exsudato inflamatório foi produzido (BECHARA & SZABÓ, 2009).

A carragenina, sendo um composto com potencial comprovado para induzir reação inflamatória aguda, foi utilizada para indução do edema nas patas direitas traseiras dos camundongos e realização dos experimentos para investigar possível propriedade anti-inflamatória da *Eugenia dysenterica*. Antes do experimento para avaliação do efeito antiedematogênico do extrato aquoso, foi realizada a padronização (1) da concentração de carragenina (1% ou 0,5%) que seria utilizada, (2) dos tempos para avaliação do

edema e verificou-se a eficácia do anti-inflamatório não esteroide indometacina na redução do edema de pata induzido por carragenina na dose utilizada (10mg/kg). Diante dos resultados obtidos, foi estabelecido: (1) a dose intraplantar de carragenina 0,5%, pois foi eficaz na indução do edema de pata, o qual foi mensurável no plestímetro; além de provocar menor desconforto aos animais; (2) o anti-inflamatório indometacina na dose 10mg/Kg, v.o., foi eficiente na redução do edema causado pela carragenina 1% e 0,5%, em todos os tempos avaliados; (3) foram definidos os tempos de 1, 2, 3, 4, 5 e 6 horas para avaliação do edema de pata; foram excluídos os tempos de avaliação de 15 e 30 minutos pois é possível que aumento de volume de pata nesses tempos seja o próprio volume da carragenina injetada e não ao edema decorrente da inflamação.

Após padronização, foram realizados os experimentos com o extrato aquoso obtido das folhas da *Eugenia dysenterica* nas concentrações de 100, 550 e 1000 mg/kg. Em todas as concentrações do extrato utilizadas para tratamento dos animais, não foi observado redução do edema de pata induzido por carragenina, comparado ao grupo controle negativo. A quantificação do edema foi realizada utilizando-se plestímetro, assim como na avaliação de redução de edema de pata em camundongos através do extrato metanólico da *Annona crassiflora* supracitado (ROCHA et al., 2015). Entretanto, há outros instrumentos que podem ser usados para quantificar edema de pata, como alternativa ao plestímetro, como o paquímetro. Esta ferramenta é semelhante à uma pinça e possui precisão absoluta, podendo ser do tipo manual ou digital. Em formato de L, possui um braço móvel para ajustar o objeto (pata) no meio dos bicos, sendo dois bicos superiores para medir as distâncias internas e dois bicos inferiores para medir as distâncias internas do objeto (MECÂNICA INDUSTRIAL, 2018).

Após avaliação da ação antiedematogênica as patas traseiras dos animais dos grupos foram seccionadas para avaliação histopatológica e dosagem de MPO. Como não há dados na literatura de como ocorre o processamento de amostras do músculo plantar, foi necessário a padronização. As primeiras amostras preparadas utilizando-se a pata completa e o coxim isolado, sem prévia desmineralização, foram incluídas com a face plantar voltada para baixo, mas quando feitos os cortes histológicos, as amostras foram desincluídas devido à resistência óssea. Assim, foi utilizado, o coxim com corte longitudinal dividindo-o em duas partes, sem prévia desmineralização. A amostra foi incluída com a face do corte voltada para baixo e foi possível o corte em micrótomo; contudo, após confecção da lâmina, as fibras musculares não foram preservadas. Diante do exposto, foi feita a desmineralização de amostras de coxim isolado e coxim isolado com corte longitudinal sem secção completa; não houve resistência óssea ao corte no micrótomo e, após confecção das lâminas, foram observadas fibras musculares preservadas e presença de infiltrado inflamatório. Assim, padronizou-se que a amostra utilizada seria o coxim isolado e com corte longitudinal.

No presente estudo, outro modelo experimental para investigação de possíveis atividades anti-inflamatórias do extrato aquoso da *E. dysenterica* foi por meio da determinação da atividade da enzima MPO em amostras teciduais de animais tratados com diferentes concentrações do extrato (100, 550 e 1000 mg/Kg) e animais tratados com o veículo carboximetilcelulose 0,5% ou indometacina (10 mg/kg), controles negativo e positivo para efeito anti-inflamatório, respectivamente. Em uma inflamação, as primeiras células recrutadas são os leucócitos (neutrófilos, basófilos e eosinófilos). A enzima mieloperoxidase é o principal componente de neutrófilos, localizada em seus grânulos azurófilos (GARCIA-LEME & FARSKY, 1993). Portanto, MPO constitui um marcador importante de infiltrado inflamatório neutrofílico.

A maior atividade MPO detectada no grupo controle negativo sugere que a injeção de carragenina induziu uma reação inflamatória com infiltrado neutrofílico, dados que corroboram com a análise histopatológica em amostras teciduais desse grupo experimental. O tratamento dos animais com indometacina e com o extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* nas concentrações 100 e 550 mg/kg, possivelmente, reduziu o infiltrado inflamatório, uma vez que foi detectada menor atividade MPO nesses grupos experimentais. Contudo, a maior atividade MPO detectada em amostras de animais tratados com concentração mais elevada do extrato (1000 mg/kg) pode estar associada a um efeito de toxicidade, o qual merece ser investigado. O extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* não apresentou efeito antiedematogênico embora tenha sido observada tendência de redução de infiltrado neutrofílico no tecido inflamado.

A ausência de diferença estatística significativa entre os grupos experimentais pode estar associada ao tamanho amostral e grande variabilidade interindividual nos animais ou ausência compostos bioativos com efeito inibitório sobre o edema de pata induzido por carragenina.

8 CONCLUSÕES

- Na padronização do método de edema de pata induzido por carragenina, ambas as concentrações de carragenina utilizadas (0,5 e 1,0 %) foram adequadas para a indução do edema de pata.
- O anti-inflamatório indometacina (10 mg/Kg) foi eficaz na redução do edema de pata induzido por ambas as concentrações de carragenina (0,5 e 1,0 %).
- Indometacina foi mais eficaz na redução do edema de pata após 4 e 6 horas a injeção intraplantar de carragenina 0,5 ou 1%.
- O extrato aquoso obtido das folhas da planta *Eugenia dysenterica* nas concentrações de 100, 550 e 1000 mg/kg, não reduziu o edema de pata induzido por carragenina.

- Houve tendência à redução na atividade da MPO nos tratamentos com extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* nas concentrações de 100 mg/kg e 550 mg/kg, comparável ao controle positivo. A atividade de MPO nas amostras dos animais tratados com extrato aquoso da *Eugenia dysenterica* na concentração 1000 mg/kg foi comparável ao grupo controle negativo.

9 PERSPECTIVAS FUTURAS

Novos experimentos utilizando um número maior de animais são necessários para a investigação de possível efeito anti-inflamatório do extrato aquoso da *Eugenia dysenterica*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. **Determinação de taninos em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido.** Química Nova, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- BECHARA, G.H., SZABÓ, M. P. J. **Processo inflamatório. Alterações vasculares e mediação química.** Adam; 1-15, 2009.
- BEHLING, E. B.; SENDÃO, M., C.; FRANCESCATO, H.D.C.; ANTUNES, L.S.G.; BIANCHI, M.L.P. **Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas.** Alim. Nutr., Araraquara, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.
- BRANDÃO, A. **ANTI-INFLAMATÓRIOS: uma compreensão total.** Pharmacia Brasileira nº 81. Entrevista ao farmacêutico Carlos Alberto Balbino, abril/maio 2011.
- BRANDÃO, M.; FERREIRA, P. B. D. **Flora apícola do cerrado.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 7-14, 1991.
- BRASIL. Ministério Da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS:** Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília – DF, 2006. 60 p. (Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2004-2006/2006/Decreto/D5813.htm)
- CARDOSO, L. M.; MARTINO, H. S. D.; MOREIRA, A. V. B.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. **Cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) of the Cerrado of Minas Gerais, Brazil: physical and chemical characterization, carotenoids and vitamins.** Food Research International, Essex, v. 44, n. 7, p. 2151-2154, 2011.
- CARUSO, C.; LIO, D.; CAVALLONE, L.; FRANCESCHI, C. **Aging, longevity, inflammation, and cancer.** Ann N Y Acad Sci. 1028:1–13, 2004.

COBEA Colégio brasileiro de Experimentação Animal. **Manual para técnicos em Bioterismo**, 2ª ed. São Paulo: COBEA, FINEP, 1996. 259 p.

CORREIA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: IBDF. v. 1, 747 p., 1994.

COSTA, M.; JESUS, T. L.; LOPES, B. R. P.; ANGOLINI, C. F. F.; Montagnolli, A.; GOMES, L. P. G.; PEREIRA, G. S. P.; RUIZ, A. L. T. G.; CARVALHO, J. E. C.; EBERLIN, M. N.; SANTOS, C.; TOLEDO, K. A. **Eugenia aurata and Eugenia punicifolia HBK inhibit inflammatory response by reducing neutrophil adhesion, degranulation and NET release**. BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 16, 2016.

COSTA, T. R.; FERNANDES, O. F. L.; SANTOS, S. C.; OLIVEIRA, C. M. A.; LIÃO, L. M.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R.; FERREIRA, H. D.; SALES, B. H. N.; SILVA, M. R. R. **Antifungal activity of volatile constituents of Eugenia dysenterica leaf oil**. Journal of Ethnopharmacology, [S.l.], v. 72, p. 111-117, 2000.

DI ROSA, M. **Biological properties of carrageenan**. Journal of Pharmacy and Pharmacology 24, 89–102, 1972

DONADO-PESTANA, C. M., dos SANTOS-DONADO, P. R., DAZA, L. D., BELCHIOR, T., FESTUCCIA, W. T., & GENOVESE, M. I. **Cagaita fruit (Eugenia dysenterica DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity**. Food Research International, 103, 40–47, 2018.

DUTRA, R. C., TAVARES, C. Z., FERRAZ, S. O., SOUSA, O. V., PIMENTA, D.S. **Investigação das atividades analgésicas e anti-inflamatória do extrato metanólico dos rizomas de Echinodorus grandiflorus**. Revista Brasileira de Farmacognosia, João Pessoa, vol.16, no.4, 2006.

EFRAIM, P.; TUCCI, M. L.; GARCIA, N. H. P.; HADDAD, R.; EBERLIN, M. **Teores de compostos fenólicos de sementes de cacaueteiro de diferentes genótipos**. Brazilian Journal of Food Technology, Campinas, v. 9, n. 4, p. 229-236, 2006.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. **Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteu reagent**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, Washington, v. 58, p. 8.139-8.144, 2010.

FINCH, C.E. **Developmental origins of aging in brain and blood vessels: An overview**. Neurobiol Aging. 26:281–91,2005.

FUNK, C.D. **Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology**. Science, 294 (5548), 1871-5, 2001.

GALHEIGO, M. R. U., PRADO, L. C. da S., MUNDIN, A. M. M., GOMES, D. O., CHANG, R., LIMA, A. M. C., CANABRAVA, H. A. N., BISPO-DA-SILVA, L. B.. **Antidiarrhoeic effect of Eugenia dysentericaDC (Myrtaceae) leaf essential oil**. Natural Product Research, 30(10), 1182–1185, 2015.

GARCIA-LEME, J., FARSKY, S.P. **Hormonal control of inflammatory responses.** *Mediators of Inflammation* 2, 181–98, 1993

GASCA, C. A., CASTILLO, W. O., TAKAHASHI, C. S., FAGG, C. W., MAGALHÃES, P. O., FONSECA-BAZZO, Y. M., & SILVEIRA, D. **Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves.** *Food and Chemical Toxicology*, 109, 996–1002, 2017.

Guia Brasileiro de Boas Práticas em Eutanásia em Animais - Conceitos e Procedimentos Recomendados - Brasília, 2012.

Disponível em:
<http://portal.cfmv.gov.br/uploads/files/Guia%20de%20Boas%20Pr%C3%A1ticas%20para%20Eutanasia.pdf.pdf>

HALICI, Z.; DENGIZ, G.O.; ODABASOGLU, F.; SULEYMAN, H.; CADIRCI, E.; HALICI, M. **Amiodarone has anti-inflammatory and anti-oxidative properties: An experimental study in rats with carrageenan-induced paw edema.** *Eur J Pharmacol.* 566:215–21, 2007.

LADEIRA, A.M., ZAIDAN, L.B.P., FIGUEIRO-RIBEIRO, R.C.L. **Ageratum conyzoides L. (Compositae): germinação, floração e ocorrência de derivados fenólicos em diferentes estádios de desenvolvimento.** *Hoehnea* 15: 53-62, 1987.

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

MALHEIROS, R. S.P.; MACHADO, L.L.; MAPELI, A. **Investigação fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante de extratos foliares de *Eugenia dysenterica* DC.** *CCBY.* 10.17807, 2014.

MACEDO, J. F. **Plantas corticosas do Cerrado e sua utilização.** *Informe Agropecuário*, Belo Horizonte, v. 15, n. 168, p. 33-37, 1991.

MECÂNICA INDUSTRIAL. **O que é um paquímetro**, c2018. Página Inicial > Ferramentas e dispositivos > O que é um paquímetro. Disponível em <<https://www.mecanicaindustrial.com.br/o-que-e-um-paquimetro>>. Acessado em: 16 de nov. de 2018, 13:48.

MENDONÇA, R.C., FELFILI, J.M., WALTER, B.M.T., SILVA-Jr., M.C., REZENDE, A.V., FILGUEIRAS, T.S., NOGUEIRA, P.E. & FAGG, C.W. **Flora vascular do cerrado: Checklist com 12.356 espécies.** *Cerrado: ecologia e flora.* (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, ed.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.417-1279, 2008.

PEREIRA, M. C.; STEFFENS, R. S.; JABLONSKI, A.; HERTZ, P. F.; RIOS, A. O.; VIZZOTTO, M.; FLORES, S. H. **Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, Washington, v. 60, n. 12, p. 3061-3067, 2012.

PIETROVSKI, E.F.; MAGINA, M.D.A.; GOMIG, F.; PIETROVSKI, C.F.; MICKE, G.A.; BARCELLOS, M.; PIZZOLATTI, M.G.; CABRINI, D.A.; BRIGHENTE, I.M.C.; OTUKI, M.F. **Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam. (Myrtaceae) leaves.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 60, p. 479-487, 2008.

PRADO, L.C.S.; SILVA, D.B.; OLIVEIRA-SILVA, G.L.; HIRAKI, K.R.N.; CANABRAVA, H.A.N.; BISPO-DA-SILVA, L.B. **The gastroprotective effects of *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae) leaf extract: the possible role of condensed tannins.** *Biol. Pharm. Bull.*, 37(5), p. 722-730, 2014.

PROENÇA, C. E. B.; GIBBS, P. E. **Reproductive biology of eight sympatric Myrtaceae from central Brazil.** *New Phytologist*, Cambridge, v. 126, p. 343-354, 1994.

RIBEIRO, E. M. G. **Atividade antioxidante e polifenóis totais do fruto de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC) com e sem casca.** *Dissertação (mestrado)*. Rio de Janeiro, 2011.

RIBEIRO, J. F.; FONSECA, C. E. L.; ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SILVA, J. A. da; SANO, S. M. **Espécies arbóreas de usos múltiplos da região do cerrado: caracterização botânica, uso potencial e reprodução.** In: CONGRESSO BRASILEIRO SOBRE SISTEMAS AGROFLORESTAIS NOS PAÍSES DO MERCOSUL, Porto Velho. Anais. Colombo: Embrapa-CNPq; Porto Velho: Embrapa-CPAF-RO, 1994. p. 335-355, 1994.

ROCHA, R. S., KASSUYA, C. A. L., FORMAGIO, A. S. N., MAURO, M. de O., ANDRADE-SILVA, M., MONREL, A. C. D., CUNHA-LAURA, A. L., VIEIRA, M. C., OLIVEIRA, R. J. **Analysis of the anti-inflammatory and chemopreventive potential and description of the antimutagenic mode of action of the *Annona crassifloramethanolic* extract.** *Pharmaceutical Biology*, 54(1), 35-47, 2015

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; AGOSTINICOSTA, T. S. **Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado/Total phenolics and condensed tannins in native fruits from Brazilian savanna.** *Revista Brasileira de Fruticultura, Jaboticabal*, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

RUS, H.; NICULESCU, F.I. **Inflammation, aspirin, and the risk of cardiovascular disease.** *N Engl J Med*. 337:423, 1997.

SALVEMINI, D., WANG, Z.Q., WYATT, P.S., BOURDON, D.M., MARINO, M.H., MANNING, P.T., CURRIE, M.G. **Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation.** *British Journal of Pharmacology* 118, 829-38, 1996

SANO, S. M.; FONSECA, C. E. L. da; RIBEIRO, J. F.; OGA, F. M.; LUIZ, A. J. B. **Folhação, floração, frutificação e crescimento inicial da cagaiteira em Planaltina, DF.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, Brasília, v. 30, n. 1, p. 5-14, jan., 1995.

SERAFINI, M.; PELUSO, I.; RAGGUZZINI, A. **Flavonoids as antiinflammatory agents.** *P Nutr Soc* 69: 273-278, 2010.

- SILVA, R. S. M. **Caracterização de sub-populações de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) da região sudeste do estado de Goiás, Brasil.** 1999. 107 f. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 1999.
- SILVA, R. S. M.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. **Caracterização de frutos e árvores de cagaita (*Eugenia dysenterica* DC.) no sudeste do estado de Goiás, Brasil.** *Rev. Bras. Frutic.*, v. 23, n. 2, p. 330-334, 2001.
- SIQUEIRA, J. O.; SAFIR, G. R.; NAIR, M. G. **Stimulation of vesicular-arbuscular mycorrhiza formation and growth of white clover by flavonoid compounds.** *New Phytologist*, v. 118, n. 1, p. 87-93, 1991.
- SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. **Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel.** *Revista Brasileira de Fruticultura*, Jaboticabal, v. 30, n. 1, p. 59-64, 2008.
- TAKAO, L. K., IMATOMI, M., & GUALTIERI, S. C. J. **Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna).** *Brazilian Journal of Biology*, 75(4), 948–952, 2015.
- VAN ARMAN, C. G.; BEGANY, J.; MILLER, L. M.; PLESS, H. H. **Some details of inflammations caused by yeast and carrageenan.** *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, v. 150, p. 328-34, 1965.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R. **Biphasic development of carrageenin edema in rats.** *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 166, 96- 103, 1969
- VITEK, R., de NOVAIS, L. M. R., TORQUATO, H. F. V., PAREDES-GAMERO, E. J., de CARVALHO, M. G., de SOUSA, P. T., ... da SILVA, V. C. **Chemical constituents and antileukemic activity of *Eugenia dysenterica*.** *Natural Product Research*, 31(16), 1930–1934, 2016.
- WANG, S., MOUSTAID-MOUSSA, N., CHEN, L., MO, H., SHASTRI, A., SU, R., SHEN, C. L. **Novel insights of dietary polyphenols and obesity.** *Journal of Nutritional Biochemistry*, 25(1), 1–18, 2014.
- XUE, N., WU, X., WU, L., LI, L., & WANG, F. **Antinociceptive and anti-inflammatory effect of Naringenin in different nociceptive and inflammatory mice models.** *Life Sciences*, 2018.

ANEXO I



Universidade Federal de Uberlândia

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)

Rua Ceará, S/N - Bloco 2D, sala 02 – CEP 38405-315

Campus Umuarama – Uberlândia/MG – Ramal (VoIP) 3423;

e-mail: ceua@propp.ufu.br; www.comissoes.propp.ufu.br

ANÁLISE FINAL Nº 084/18 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 005/18

Projeto Pesquisa: “Estudo da Atividade Farmacológica Anti-inflamatória do Extrato de *Eugenia dysenterica* em modelo experimental *in vivo*”.

Pesquisador Responsável: Celene Maria de Oliveira Simões Alves

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

Situação: PROTOCOLO DE PESQUISA **APROVADO**.

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

Uberlândia, 24 de maio de 2018.

Prof. Dr. Lúcio Vilela Carneiro Girão

Coordenador da CEUA/UFU

Portaria nº 665/17