

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICA E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE FARMÁCIA

ARIELLY ANDRADE VIEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO
DO FRUTO DE *Vaccinium macrocarpon***

SÃO CRISTOVÃO
2019

ARIELLY ANDRADE VIEIRA

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO
DO FRUTO DE *Vaccinium macrocarpon***

Trabalho de conclusão de curso de graduação apresentado ao curso de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Farmácia.

Orientador: Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo

SÃO CRISTOVÃO

2019

AGRADECIMENTOS

Não poderia iniciar sem agradecer a ele que me deu permissão para vivenciar este momento e me presenteou com uma vida de paz, uma família incrível e bons amigos, obrigada Deus, por tudo e por tanto.

A minha linda família, cada um a seu jeito foi essencial para essa conquista. Amo vocês. Ao meu melhor amigo, companheiro de todas as horas e dono de uma inesgotável paciência, meu Pedro Hugo, obrigada por tanto, te amo.

Os meus companheiros de jornada, de maneira especial Rayra (cabeça), Elindayane (Nil), Bruno (O mais riley do grupo), Marcelo (Dinosoor) e Gigi nossa professora arretada pelo companheirismo no desespero pré e pós provas, pela paciência, pelos ensinamentos, pelo carinho, enfim tantos momentos, que por falta de espaço, não de histórias me detenho a dizer: não teria conseguido sem vocês.

Ao meu orientador Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo, que me fez entender o verdadeiro significado das palavras humildade, maturidade, respeito e determinação. Obrigada, por cada vez que subi aquela escada e fui recebida com atenção e paciência (mesmo diante dos meus estados de crise existencial), pelos ensinamentos, por ser além de um orientador, um amigo e dono dos melhores comentários nas correções. O senhor sempre será um exemplo humano e profissional a seguir.

Aos meus mestres, que com calma e dedicação ensinaram, ouviram as reclamações, responderam aos questionamentos, levo de cada um lições de coragem, carinho, conhecimento e amor pelo ensino e pesquisa, “Se cheguei até aqui foi porque me apoiei nos ombros de gigantes” (I. Newton).

Aos companheiros de pesquisa do Lafapi, Alan, Dani, Janaina, Betânia, Bruno, Marília, Fabiula, Jessica, Luiz André, Kamila, David, Julio, Pietro, pelas discussões enriquecedoras, apoio, amizade e paciência.

A Liga de farmacologia (LIFAR) pelos ensinamentos e oportunidades.

Enfim a todos aqueles que direta ou indiretamente me honraram com o prazer da convivência, tornando essa caminhada mais leve e enriquecedora, nada disso seria assim tão marcante e feliz sem vocês.

Muito obrigada!

RESUMO

Atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico do fruto de *Vaccinium macrocarpon*. Vieira, Arielly Andrade, 2019. A inflamação é uma resposta natural do organismo visando manter a integridade do mesmo. Porém, quando ocorre de maneira exacerbada, pode levar a processos patológicos. Vários são os medicamentos existentes para tratar tal condição, mas trazem consigo efeitos indesejados. Nesse sentido, existe a necessidade de buscar outras alternativas terapêuticas e as plantas medicinais são um caminho promissor visto que, representam historicamente uma fonte de compostos para o tratamento da inflamação. A *Vaccinium macrocarpon* é uma planta popularmente utilizada para tratar processos inflamatórios e quadros infecciosos, neste contexto, o presente estudo teve como objetivo investigar o efeito anti-inflamatório do extrato hidroetanólico do fruto da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm). Para isso, utilizou-se camundongos Swiss (20-30 g) machos, após aprovação pelo Comitê de Ética da UFS (protocolo 66/17). Para todos os ensaios *in vivo*, foram realizados edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA), no qual foram avaliados o edema, atividade de mieloperoxidase (MPO), concentração de interleucina (IL)-1 β , alterações histológicas e marcadores de alterações oxidativas. Como resultado, na inflamação induzida na orelha, a administração do *EHVm* (3 mg/orelha) concomitante ao TPA reduziu o edema ($p < 0,001$), a atividade da MPO ($p < 0,01$) e a concentração de IL-1 β ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo veículo, o que corroborou a análise histológica, na qual verificou-se menor presença de infiltrado inflamatório agudo e ausência desse infiltrado em região perianexial na orelha de animais tratados com o *EHVm*. Houve também diminuição da peroxidação lipídica com nas orelhas tratadas com o *EHVm* (0,3; 1 e 3 mg/orelha; $p < 0,001$) e nas doses de 1 e 3 mg/orelha de *EHVm* houve aumento do poder antioxidante do tecido medido pelo potencial reducional de ferro ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$ respectivamente) quando comparado ao grupo veículo. Estes resultados conduziram à conclusão de que o *EHVm* possui atividade anti-inflamatória que pode estar parcialmente atrelado ao seu efeito antioxidante.

Descritores: Inflamação, Antioxidante, *Vaccinium macrocarpon*, Planta medicinal.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EHVm	Extrato hidroetanólico da <i>Vaccinium macrocarpon</i>
ERN	Espécies reativas de nitrogênio
ERO	Espécies reativas de oxigênio
FRAP	Ensaio de potencial reducional de ferro
IL	Interleucina
MPO	Mieloperoxidase
OH[•]	Radical hidroxila
TNF	Fator de necrose tumoral
TPA	12-O-tetradecanoilforbol acetato
TPTZ	2,4,6-tripiridil-s-triazina

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Vaccinium macrocarpon</i> Aiton. Adaptado de: New England Wild Flower Society.	11
Figura 2 - Atividade do extrato hidroetanólico da <i>vaccinium macrocarpon</i> (EHVm) no peso das orelhas induzidas por 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos.....	18
Figura 3 - Atividade do EHVm na atividade da mieloperoxidase em orelhas de camundongos induzidas por TPA.....	19
Figura 4 - Atividade do extrato hidroetanólico de <i>Vaccinium macrocarpon</i> na concentração da IL-1 β nas orelhas de camundongos estimuladas com TPA.....	20
Figura 5 - Atividade do extrato hidroetanólico da <i>Vaccinium macrocarpon</i> (EHVm) na peroxidação lipídica (<i>status oxidativo</i>) em orelhas de camundongos submetidos a inflamação por (TPA)	21
Figura 6 - Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da <i>Vaccinium macrocarpon</i> (EHVm) pelo potencial reducional.....	21
Figura 7 - Imagens representativas de cortes histológicos (Aumento de 400x) das orelhas de camundongos submetidas à aplicação de veículo (acetona).....	22
Figura 8 - Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).....	22
Figura 9 - Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, E, F, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).....	23
Figura 10 - . Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e submetidas ao tratamento concomitante com extrato hidroetanólico da <i>Vaccinium macrocarpon</i> (EHVm).....	24
Figura 11 - Imagens representativas de corte histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e submetidas ao tratamento concomitante com dexametasona.....	25

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	6
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1. Inflamação.....	7
2.2. Plantas medicinais.....	9
2.3 <i>Vaccinium macrocarpon</i>	10
3. OBJETIVO	12
3.1. Objetivo geral.....	12
3.2. Objetivo específicos.....	13
4. MATERIAL E MÉTODOS	13
4.1 Material vegetal.....	13
4.2. Animais.....	13
4.3. Edema de orelha induzido pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA)	14
4.3.1. Massa das orelhas de camundongos estimuladas com TPA.....	14
4.3.2. Atividade de mieloperoxidase (MPO) nas orelhas de camundongos estimuladas com TPA	15
4.3.3. Determinação de IL-1 β na orelha de camundongos estimuladas com TPA.	15
4.3.4. Determinação da concentração de TBARS na orelha de camundongos estimulada com TPA.....	16
4.3.5. Avaliação da capacidade antioxidante do EHVm pelo FRAP na orelha de camundongos estimulada com TPA.....	16
4.4 Análise Histológica das orelhas.....	17
4.5 Análise estatística.....	17
5. RESULTADOS	18
6. DISCUSSÃO	25
7. CONCLUSÃO	31
8. REFERÊNCIAS	31

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é um mecanismo múltiplo e necessário à sobrevivência, geralmente benéfica ao organismo e que busca restabelecer a estrutura e função do tecido e/ ou órgão pela eliminação do agente inicial da lesão e a proteção do organismo. É uma resposta mediada pelo sistema imune e caracterizada por uma cascata de eventos fisiológicos que incluem alterações na microcirculação no local inflamado (CHANDRASEKHARAN et al.,2015; CHAMUSCA et al., 2012). No entanto, em condições em que a resposta inflamatória se perpetua, os produtos celulares como as proteases neutras entre outros podem acometer o parênquima tecidual intacto (LIMA et al, 2007; TENÓRIO, et al, 2012), levando a agressão aos tecidos saudáveis e consequentes processos patológicos (LAWRENCE et al., 2007).

Neste sentido, muitas são as pesquisas e atenções voltadas para o desenvolvimento de terapias que busquem tratar tais condições. Entre estas destacam-se o uso dos glicocorticoides e dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES). No entanto, o uso prolongado ou em altas doses desses fármacos produzem efeitos indesejados, como lesão gástrica, nefrotocidade, náusea e vômitos (BADRI et al., 2016). Este fato leva a comunidade científica a buscar outras opções terapêuticas que agreguem maior segurança, eficácia e economia.

Dentre estas outras alternativas destacam-se o uso de produtos derivados de plantas medicinais, pois estas possuem compostos promissores, com possibilidade de menos efeitos indesejados e menor custo (GHASEMIAN et al.,2016). Aproximadamente 85% da população brasileira faz uso da medicina tradicional (BRASIL,2006), embora muitos compostos ou preparações de plantas podem apresentar toxicidade relevante, uma questão que precisa ser considerada durante o *screening* de novas alternativas terapêuticas.

Neste interim, a *Vaccinium macrocarpon* Aiton, é uma pequena planta verde que contém flores cor-de-rosa escuras, cujos frutos são popularmente conhecidos como *cranberry* e são usados na forma de sucos em diversas regiões, faz parte da família da Ericaceae e é desenvolvida em ambientes úmidos, como florestas e pântanos nos países norte-americanos (SAONA et al., 2011). Estudos sugerem seu uso em uma

variedade de condições inflamatórias, nos quais observou-se efeito inibitório sobre IL-6, IL-8 e prostaglandinas (BODET et al., 2007; XIAO et al., 2015).

É importante mencionar também que o *cranberry* foi utilizado em um estudo de câncer de bexiga e foi demonstrada a redução no peso, indicando uma diminuição no tamanho do tumor e na proliferação celular (PRASAIN et al., 2008). Também há relatos de que preparações de *cranberry* possuam efeito hepatoprotetor (GLISAN et al., 2016), cardioprotetor (NOVOTNY et al., 2015), adjuvante no tratamento da obesidade (ANHÊ et al., 2015) e no tratamento de infecções do trato urinário (MUTLU et al., 2012).

Frente a tais dados, verifica-se que há estudos publicados sobre as diversas possibilidades terapêuticas advindas do *cranberry*, inclusive as anti-inflamatórias, porém está ainda é pouco referida em modelos de inflamação aguda, principalmente após aplicação por via tópica. Neste sentido, o presente trabalho foi delineado objetivando avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico da *V. macrocarpon* (EHVm) em modelo de inflamação de orelha.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Inflamação

A inflamação é um mecanismo homeostático de defesa dos tecidos vascularizados, com o objetivo de remover os agentes lesivos e restabelecer as funções normais do organismo (RAHMATI et al., 2016). Tais agentes podem ser de natureza física (trauma mecânico, radiação, calor, frio), química (substâncias irritantes e álcalis) e biológica (fungos, bactérias, vírus e protozoários) (LIMA et al 2007). A agressão advinda desse processo suscita mudanças vasculares, celulares e imunológicas tais como vasodilatação, aumento da permeabilidade capilar e migração celular, o que leva aos cinco sinais clínicos locais da inflamação: dor, calor, rubor, edema e perda de função (MEDZHITOV, 2010).

As descrições destas características clínicas foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os

quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d.C., sendo o quinto sinal acrescentado por Virchow no século XIX (LAPA et al., 2007). Essa conjuntura demonstra o interesse desde os primórdios acerca dos fundamentos e sinais desse processo, considerando sua importância na patologia e na sobrevivência humana.

A inflamação como o processo complexo que se constitui, envolve alterações vasculares caracterizadas por vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular e eventos celulares caracterizados pela migração dos leucócitos da microcirculação com acúmulo no foco de infecção, o que sinaliza recrutamento e ativação celular. (BILATE, 2007). O processo atua destruindo (fagocitose e anticorpos), diluindo (plasma extravasado) e isolando ou sequestrando (malha de fibrina) o agente agressor, além de abrir caminho para os processos reparativos (cicatrização e regeneração) do tecido afetado (FULLERTON et al., 2016).

O delineamento destas ações dependerá da intensidade, natureza e duração do estímulo lesivo. Em casos onde este for de curta duração, ou rapidamente anulado pelos mecanismos de defesa do organismo, as alterações inflamatórias sofrerão rápida resolução, sendo denominadas de agudas (REUTER et al., 2010). Entretanto em condições em que o estímulo nocivo é de duração mais longa e a lesão tissular é perpetuado, há um retardo no processo de reparação tecidual e tem-se a inflamação crônica.

Caracteriza-se como inflamação aguda, aquela na qual há uma progressão de horas a dias, sendo caracterizada por vasodilatação, exsudação plasmática e migração de células para o sítio lesado, com a participação de células leucocitárias, como os macrófagos, neutrófilos, mastócitos e basófilos que agem mediante a liberação de citocinas, como as interleucinas (IL)-1 e 6 e o fator de necrose tumoral (TNF)- α ou mediadores inflamatórios como as prostaglandinas e leucotrienos e a produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) e nitrogênio (ERN) (SAH; DAWRA; SALUJA, 2013). Diversos sistemas bioquímicos, como o sistema complemento e de coagulação, são ativados e auxiliam no estabelecimento e resolução do processo inflamatório (CRUVINEL et al 2010).

As desordens crônicas por sua vez são caracterizadas por longa duração (semanas, meses ou anos) com inflamação ativa, destruição tecidual e tentativa de reparo ocorrendo simultaneamente, mas de forma insuficiente. Infiltração de células mononucleares, neoangiogênese e fibrose são características histológicas típicas de inflamação crônica (NORLING, 2010), além da presença de produtos celulares como as proteases neutras, metaloproteinases e elastases que podem levar a degradação de colágeno, elastina e fibrina do parênquima tecidual intacto, o que ocasiona uma agressão aos tecidos saudáveis do hospedeiro (LIMA et al, 2007; TENÓRIO, et al, 2012).

Para tratar o quadro inflamatório a estratégia principal consiste em reduzir a formação dos mediadores da inflamação. Os anti-inflamatórios não esteroidias (AINES) são amplamente empregados na terapêutica, sendo representados por medicamentos como diclofenaco e ibuprofeno, possuem atividade na inibição específica da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) e levam a consequente redução da conversão do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas (JÚNIOR et al.,2007). No entanto, o uso prolongado ou em altas doses desses fármacos produzem efeitos indesejados, como lesão gástrica, nefrotoxicidade, náusea e vômitos (BADRI et al., 2016), o que contribui para uma busca por novas alternativas terapêuticas.

2.2 Plantas Medicinais

Historicamente, as plantas medicinais se constituíram como uma ferramenta primordial na terapêutica clínica. Compreende-se que desde os tempos mais antigos até os dias atuais, as mais diversas patologias têm sido tratadas com chás e infusões, obtidas a partir deste âmbito terapêutico (HARVEY, 2015). Dados da OMS demonstram que pelo menos 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta para fins medicinais, o que valida o papel fundamental do estudo das plantas medicinais na saúde.

São inúmeros os benefícios relatados para a terapia com fitoterápicos, como menor custo com pesquisas, vantagens culturais, e eficácia no tratamento de malefícios, além de apresentarem vários componentes com ações similares aos já

existentes no mercado, mas com relativa diminuição dos riscos de efeitos colaterais (ASADI et al., 2015).

O Ministério da Saúde, reconhecendo o potencial terapêutico das plantas medicinais e com o objetivo de promover o maior aproveitamento de recursos pela população brasileira, aprovou a RENISUS, que inclui 71 espécies vegetais selecionadas pelo amplo uso popular. Isso reitera a importância da medicina tradicional e medicina complementar (HARVEY, 2015) e corrobora para o processo de busca por espécies vegetais que possam ser utilizadas na fabricação de novos compostos de interesse médico e farmacêutico (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006; DE FREITAS et al., 2017).

Entretanto, se faz necessário ressaltar o temor frente ao uso incorreto de plantas medicinais pela população, sendo fundamental o apoio ao estudo etnobotânico e etnofarmacológico, pelo do aporte à pesquisa científica e o estreitamento de laços entre a academia, a sociedade e a indústria, para assim incrementar os conhecimentos relacionados à eficácia e segurança dessas plantas, oferecendo alternativas terapêuticas seguras e acessíveis a comunidade e aos profissionais de saúde (DUTRA et al., 2016).

2.3 *Vaccinium macrocarpon*

Entre as plantas medicinais com importantes atividades terapêuticas, temos a *Vaccinium macrocarpon* Aiton, conhecida popularmente como *cranberry*, encontrada em grande escala na América do Norte (SKROVANKOVA, SUMCZYNSKI, MLCEK, JURIKOVA, SOCHOR, 2015). A *Vaccinium macrocarpon* é um arbusto perene, da família Ericaceae e do gênero *Vaccinium*, com folhas pequenas e flores de cor rosa escura, sendo seu fruto inicialmente uma baga de cor branca, mas que se torna vermelho escuro (Figura 1) quando completamente maduro, sendo comestível, de sabor adocicado e levemente ácido (DINH et al., 2014). É descrito seu consumo de várias formas, desde a baga fresca ao seu sumo concentrado, baga desidratada, chás e até mesmo em suplementos alimentares (comprimidos/cápsulas) (PARDO-MATES

et al., 2017), no entanto os principais achados estão relacionados ao uso de seus frutos sobretudo em forma de suco (BÁRTÍKOVÁ et al., 2014).



Figura 1 - *Vaccinium macrocarpon* Aiton. Adaptado de: New England Wild Flower Society

Diversos estudos foram realizados a fim de caracterizar as atividades farmacológicas do *cranberry*, entre elas o uso no tratamento de infecções, de condições inflamatórias e suas propriedades antioxidantes e anticancerígenas (KRESTY et al., 2011). BÁRTÍKOVÁ et al. (2014) e HAMILTON et al. (2014) demonstram, por exemplo, o uso dos frutos do *cranberry* em processos inflamatórios relacionadas ao trato urinário, como também foi demonstrado por VALENTOVAÁ et al. (2007), que avaliaram a efetividade do consumo de 400 e 1200 mg de extrato de *cranberry* no quadro de infecção do trato urinário em 65 mulheres com idade de 19 à 28 anos, durante 8 semanas. Estes autores concluíram que doses de 1200 mg de extrato de *cranberry* podem reduzir significativamente a oxidação protéica e a aderência da *E. coli* no tecido. Resultado semelhante também encontrado por STOTHERS (2002). Ademais, existem relatos científicos sugerindo seu uso em uma variedade de condições inflamatórias, nas quais observa-se efeito inibitório sobre IL-6, IL-8 e prostaglandinas (BODET et al., 2007; XIAO et al., 2015).

É importante destacar também o papel do *cranberry* em pesquisas relacionadas ao câncer, como a realizada por PRASAIN et al. (2008), com um grupo de 344 ratos durante 6 semanas, com a dose de 1 mL de suco de *cranberry* ao dia. Os autores observaram que houve uma redução no peso da bexiga, indicando uma diminuição no tamanho do tumor e na proliferação celular. O uso clínico do *cranberry* está voltado

principalmente para o tratamento de doenças do trato urinário e inflamação vascular (DURHAM; STAMM; EILAND, 2015; HISANO et al., 2012).

O *cranberry* possui em sua composição diversas substâncias biologicamente ativas de origem inorgânica e orgânica. Entre os inorgânicos destacam-se: água, potássio, cálcio, sódio, fósforo, magnésio, ferro e iodo. Em relação aos constituintes orgânicos, o *cranberry* apresenta: glucose, frutose, proteínas, ceras, pectinas, vitaminas C, A, B1 e B2, ácidos orgânicos (ácido málico, quínico, cítrico e benzóico) e compostos fenólicos, tais como, antocianinas, flavonóides, proantocianidinas e taninos condensados (SKROVANKOVA et al., 2015). Estudos evidenciam que as propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, anticancerígenas e antibacterianas que o *cranberry* possui é em significativa parte conferida por estes compostos fenólicos. (PARDO-MATES et al., 2017; MARTÍN, M et al., 2015). Tais compostos são predominantemente os flavanois (flavano-3-ol), flavonóis, proantocianidinas tipo A (PAC-A), antocianinas e ácido ursólico (KOWALSKA, K et al., 2016)

Neste interim, verifica-se que há estudos publicados sobre as diversas possibilidades terapêuticas advindas do *cranberry*, inclusive as anti-inflamatórias, porém está ainda é demonstrada de maneira incipiente, principalmente em modelos de avaliação tópica no contexto da inflamação aguda. Tal fato associado a potencialidade do uso de plantas na terapêutica motivaram a realização deste trabalho que visou avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato hidroetanólico dos frutos da *Vaccinium macrocarpon* em modelo tópico de inflamação aguda.

3. OBJETIVO

3.1 Objetivo Geral

- Investigar o efeito do extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* Ainton (EHVm) na inflamação tópica em orelhas de camundongos.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do EHVm sobre alterações vasculares e celulares no edema de orelha;
- Investigar se o tratamento com EHVm altera a concentração de IL-1 β na inflamação na orelha;
- Avaliar se o tratamento com EHVm afeta as alterações histológicas nas orelhas inflamadas;
- Avaliar o efeito do EHVm sobre a peroxidação lipídica e o potencial reducional de ferro em orelhas inflamadas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material vegetal

O extrato hidroetanólico dos frutos de *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) foi adquirido comercialmente da Fagron BV (São Paulo – São Paulo, Brasil), lote 14083757D, com certificado de análise de controle de qualidade e cedido pela Dose Certa Farmácia de Manipulação sob a responsabilidade do Me. Farm. Leandro de Oliveira Porfírio. Este extrato foi caracterizado em estudo recente do Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório, no Departamento de Fisiologia da UFS (SANTANA et al., 2018). Neste estudo foram identificados sete compostos pela técnica de cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrometria de massa, sendo três flavan-3-ols que constituíram 93,3% do total de flavonoides (catequina, epicatequina e epicatequina galato); um flavonol (quercetina-3-O-rutinosídeo) que contribuiu com 4,3% deste total e três antocianinas (cianidina-3-O-galactosídeo; cianidina-3-O-glucosídeo e cianidina-cumaroil-hexosídeo) que contribuíram com 2,4% do mesmo.

4.2 Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (20-30 g) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da UFS. Esses animais foram alocados em grupos de cinco, com livre acesso à comida e água, e foram mantidos em ciclo

claro/escuro de 12/12h, a uma temperatura de $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. Os animais foram distribuídos nos grupos experimentais de forma randomizada e os experimentos foram conduzidos de forma encoberta, isto é, os experimentadores observadores não conheciam a identidade dos grupos em estudo. Os protocolos foram realizados de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS sob o número 66/17 (Anexo A). Ao término dos experimentos foi realizada a eutanásia dos animais com dose excessiva de isoflurano (Cristália, Itapira-SP) inalatório. As carcaças foram acondicionadas em sacos plásticos e guardadas em freezer específico até o descarte definitivo de acordo com a rotina do Departamento de Fisiologia, pelo serviço de coleta seletiva de lixo biológico da UFS.

4.3 Edema de orelha induzido pelo 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA)

O edema de orelha foi realizado de acordo com a metodologia revisada por Young et al. (1989). Para tanto, os animais ($n=6-8$) foram anestesiados com isoflurano inalatório para aplicação de 20 μL de TPA (1 μg /orelha, dissolvido em acetona) nas superfícies interna e externa da orelha direita, com o auxílio de uma ponteira de polipropileno, na ausência ou presença simultânea de EHVm (0,3, 1,0 ou 3,0 mg/orelha) ou dexametasona (0,05 mg/orelha). Foi administrado acetona (20 μL) topicamente na orelha esquerda dos animais de todos os grupos e cada animal serviu como seu controle. A eutanásia foi realizada por excesso de isoflurano inalatório, 6 horas após a indução da inflamação (BOMFIM et al, 2014).

4.3.1 Massa das orelhas de camundongos estimuladas com TPA

Após eutanásia, sítios das orelhas foram recortados com um *punch* de 8 mm de diâmetro e as orelhas foram pesadas em uma balança digital. Os valores foram

expressos em mg e representaram a subtração da massa das orelhas direita em relação a esquerda de cada animal (OLIVEIRA et al., 2017).

4.3.2 Atividade de mieloperoxidase (MPO) nas orelhas de camundongos estimuladas com TPA

A atividade da enzima MPO foi utilizada como um marcador de infiltrado neutrofílico em todos os grupos experimentais. Amostras da orelha dos animais foram coletadas, pesadas e mantidas em tubos teste na presença de tampão fosfato [50 mmol/L, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB)]. Cada amostra foi homogeneizada e alíquotas do homogenato foram centrifugadas. Em placa de 96 poços, alíquotas do sobrenadante foram adicionados à solução de di-hidroclorato de o-dianisidina (0,167 mg/mL em tampão fosfato 50 mmol/L contendo 0,005% de H₂O₂). As alterações nos valores de absorbância (460 nm) foram registradas durante 180 segundos e os resultados foram expressos como unidades de MPO (UMPO)/sítio de orelha, considerando-se que 1 UMPO se refere à quantidade de enzima que degradada 1 µmol de H₂O₂/minuto (BRADLEY et al, 1982; CAMARGO et al, 2008).

4.3.3 Determinação de IL-1β na orelha de camundongos estimuladas com TPA.

As concentrações de IL-1β foram determinadas no homogenato das orelhas (n=4-5) de camundongos estimuladas com TPA usando kit comercial imunoenzimáticos (ELISA), segundo as instruções do fabricante (R&D systems). Os valores foram expressos como pg de citocinas/mg de proteína.

4.3.4 Determinação da concentração de TBARS na orelha de camundongos estimulada com TPA

Amostras de orelha de todos os grupos experimentais foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 7,4) contendo butil-hidroxitolueno (BHT, 12,6 mmol/L). A seguir, alíquotas do homogenato foram incubadas a 90°C durante 45 min com solução contendo TBA a 0,37%, em meio ácido (ácido tricloroacético a 15% e HCl a 0,25 mol/L). Após incubação e posterior centrifugação (5 min, 8000xg), alíquotas dos sobrenadantes foram extraídas com n-butanol e solução saturada de NaCl, seguido de centrifugação (2 min a 8000xg). Logo após, alíquotas foram pipetadas em microplaca para leitura dos valores de absorvância em leitor a 535 nm (corrigidos pelos valores de absorvância a 572 nm). Os resultados foram expressos como nmol de MDA por mg de tecido, utilizando-se para o cálculo o coeficiente de extinção molar de $1,55 \times 10^5$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ (BOSE; SUTHERLAND; PINSKY, 1989).

4.3.5 Avaliação da capacidade antioxidante do EHVm pelo FRAP na orelha de camundongos estimulada com TPA

Para avaliação da capacidade antioxidante do EHVm pelo potencial reducional de ferro, a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996) foi utilizada com pequenas modificações. Amostras de orelha de todos os grupos experimentais foram pesadas e homogeneizadas em 10 volumes de solução de fosfato de potássio (50 mmol/L, pH 7,4). Em placa de 96 poços foram adicionados alíquotas do homogenato, 9 µL de EHVm (1, 3, 10, 30 ou 100 µg/mL), 27 µL de água destilada e uma solução contendo tampão acetato (0,3 mol/L; pH 3,6), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ; 10 mmol/L) e cloreto férrico (Fe³⁺Cl₃; 20 mmol/L). Durante 30 min a mistura reacional foi incubada a 37°C por 30 min e posteriormente a absorvância foi mensurada a 595 nm. Para calcular o FRAP do extrato foi gerada uma curva padrão de sulfato ferroso (FeSO₄) e usada a equação linear. O trolox (100 µg/mL) foi usado como controle positivo. Os

valores foram comparados como o meio reacional sem adição de extrato ou controle positivo (sistema).

4.4 Análise Histológica de orelhas

A análise histológica das orelhas (n=8) foi realizada em colaboração com a Profa. Dra. Rosilene Calazans Soares (Departamento de Morfologia da UFS). Para análise histológica, o edema foi induzido conforme o item 4.3. Esta etapa foi realizada com orelhas tratadas com a maior dose do EHVm (3,0 mg/orelha) ou do controle positivo (dexametasona, 0,05 mg/orelha). Após a indução, o tecido da orelha foi cuidadosamente retirado e fixado em solução de etanol (70%) por um período de 24 horas. Após este período, os tecidos foram retirados e conservados em formol (10%) até o momento da realização dos cortes histológicos. Posteriormente, as orelhas foram desidratadas, incluídas em parafina e em seguida seccionadas transversalmente num micrótomo em cortes de 5 µm de espessura. Estes cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram visualizadas em microscópio óptico (Nikon, Tóquio, Japão) com aumento de 40x e então fotografadas com o auxílio de uma câmera fotográfica (Nikon, Tóquio, Japão) acoplada ao microscópio para análise de infiltrado inflamatório. Foram selecionadas 4 fotografias para os grupos Acetona e os grupos tratados com Dexametosa ou EHVm e 10 fotografias para o grupo Veículo (CHIBLI et al., 2014).

4.5 Análise Estatística

Os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média. Estes foram analisados quanto a normalidade de sua distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk. Como não houve impedimento para aplicação de testes paramétricos, os dados foram analisados por análise da variância (ANOVA) de uma via, seguida pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

5. RESULTADOS

A ação tópica do EHVm foi testada utilizando o modelo de edema de orelha induzido por TPA. Na figura 2 pode ser observado que a variação de massa da orelha foi diminuída ($p < 0,001$) pela coadministração de 3 mg/orelha de EHVm, bem como com a coadministração de dexametasona ($p < 0,001$) quando comparado aos animais que receberam somente veículo. Também pode ser verificado que o tratamento com as doses de 0,3 e 1 mg/orelha de EHVm não alterou a variação de massa da orelha quando comparado ao grupo veículo.

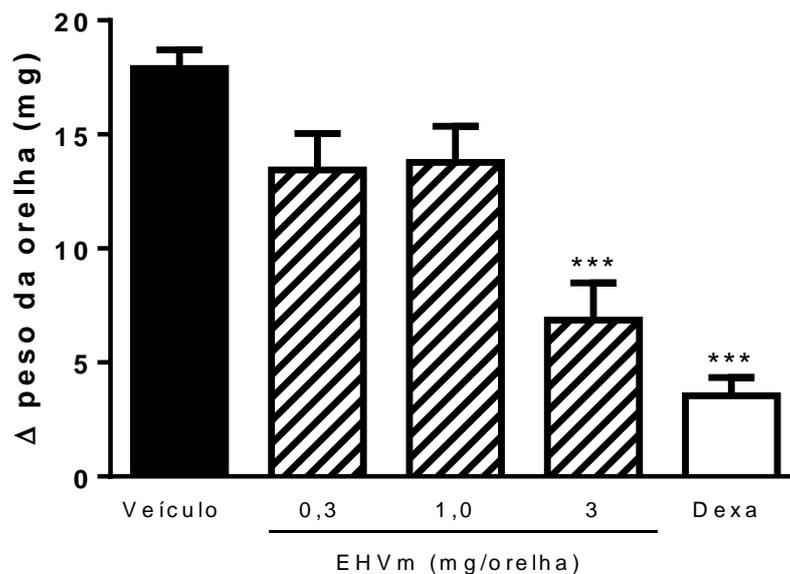


Figura 2. Efeito do extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) na massa das orelhas de camundongos. Os camundongos foram submetidos a inflamação da orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, concomitantemente ao tratamento com EHVm ou dexametasona (Dexa). A variação (Δ) do peso da orelha ($n=6-8$), mensurada 6 horas após a indução. ANOVA de uma via $F_{(4, 32)} = 16,71$, $p < 0,001$, seguido do teste de Tukey *** $p < 0,001$ vs. grupo tratado com veículo).

O efeito anti-inflamatório também foi analisado verificando-se a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A figura 3 mostra o aumento da atividade de MPO após a administração de TPA ($p < 0,001$) quando comparado as orelhas que receberam

apenas acetona. O tratamento com a dose de 3 mg/orelha do EHVm ($p < 0,01$) ou 0,05 mg/orelha de dexametasona ($p < 0,001$) diminuiu este parâmetro quando comparado ao grupo veículo. Também pode ser verificado que o tratamento com as doses de 0,3 e 1 mg/orelha de EHVm não alterou a atividade de MPO nas orelhas quando comparado ao grupo veículo.

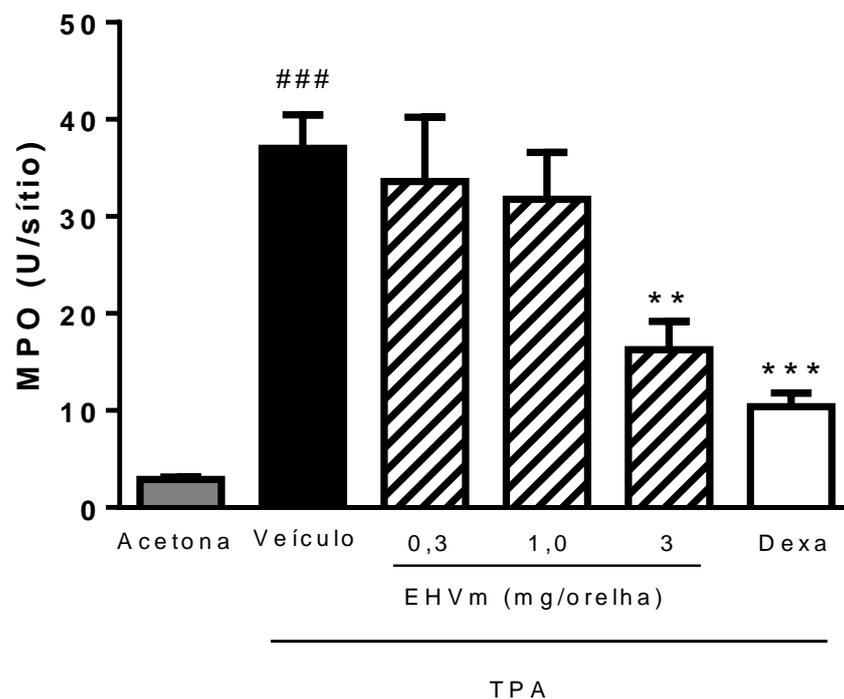


Figura 3. Efeito do extrato hidroetanólico de *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) na atividade da mieloperoxidase (MPO) em orelhas de camundongos. Os camundongos foram submetidos a inflamação da orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), concomitantemente ao tratamento com EHVm ou dexametasona (Dexa). A atividade de mieloperoxidase (MPO) ($n=6-8$) foi mensurada 6 horas após a indução. ANOVA de uma via ($F_{(5, 39)} = 13,41$, $p < 0,001$) seguido do teste de Tukey (### $p < 0,001$ vs. grupo tratado com acetona; ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ vs. grupo tratado com veículo).

Verificou-se também que a administração de TPA na orelha aumentou a concentração de IL-1 β ($p < 0,01$) em comparação ao grupo acetona. A coadministração de 3 mg/orelha de EHVm ($p < 0,05$) ou dexametasona diminuiu a concentração desta citocina ($p < 0,05$), quando comparado ao grupo que recebeu veículo, como demonstrado na figura 4.

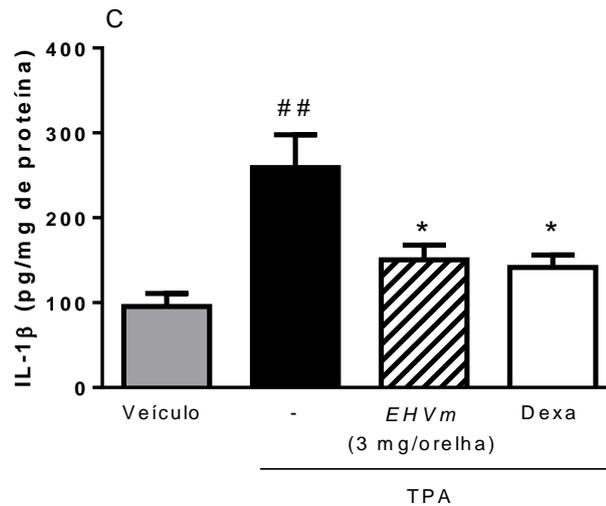


Figura 4. Efeito do extrato hidroetanólico de *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) na concentração de IL-1 β nas orelhas de camundongos. Os camundongos foram submetidos a inflamação da orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), concomitantemente ao tratamento com EHVm ou dexametasona (Dexa). A variação da concentração de IL-1 β (n=4-5) foi mensurada 6 horas após a indução. ANOVA de uma via ($F_{(3, 15)} = 8,34$, $p=0,0017$), seguido do teste de Tukey (## $p<0,01$ vs. grupo tratado com acetona; * $p<0,05$ vs. grupo tratado com veículo).

Complementarmente, foi realizada a análise histológica nas orelhas dos animais dos diferentes grupos. No corte histológico do grupo acetona foi observado tecido sem alterações morfológicas (Figura 5). Por sua vez, a aplicação de TPA nas orelhas permitiu observar a presença de intenso infiltrado inflamatório rico em leucócitos invadindo o tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado de revestimento, tecido conjuntivo e em região perianexial, caracterizando inflamação aguda além da presença de tecido conjuntivo fibroso dérmico exibindo intenso edema intersticial e grande quantidade de vasos sanguíneos capilares dilatados e congestos (hiperemiados) (Figura 6 e Figura 7).

Nos animais em que houve a aplicação do TPA na presença de EHVm foi observada a presença de infiltrado inflamatório, no entanto em menor intensidade em tecido conjuntivo e ausência de infiltrado em região perianexial, com preservação dos anexos cutâneos (Figura 8). No grupo tratado com dexametasona foi possível evidenciar tecido epidérmico exibindo características histomorfológicas usuais (Figura 9).

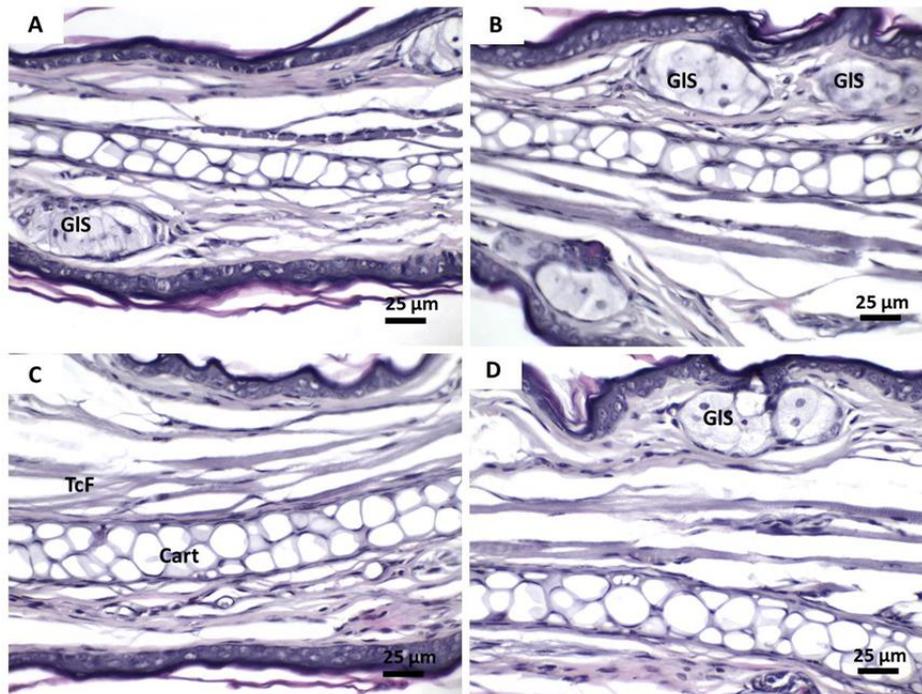


Figura 5. Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos submetidas à aplicação de veículo (acetona). Tecido epidérmico exibindo características histomorfológicas normais mostrando anexos cutâneos, como glândulas sebáceas e folículos pilosos bem preservados. GIS indica glândula sebácea, TcF indica tecido conjuntivo fibroso, Cart representa o tecido cartilaginoso.

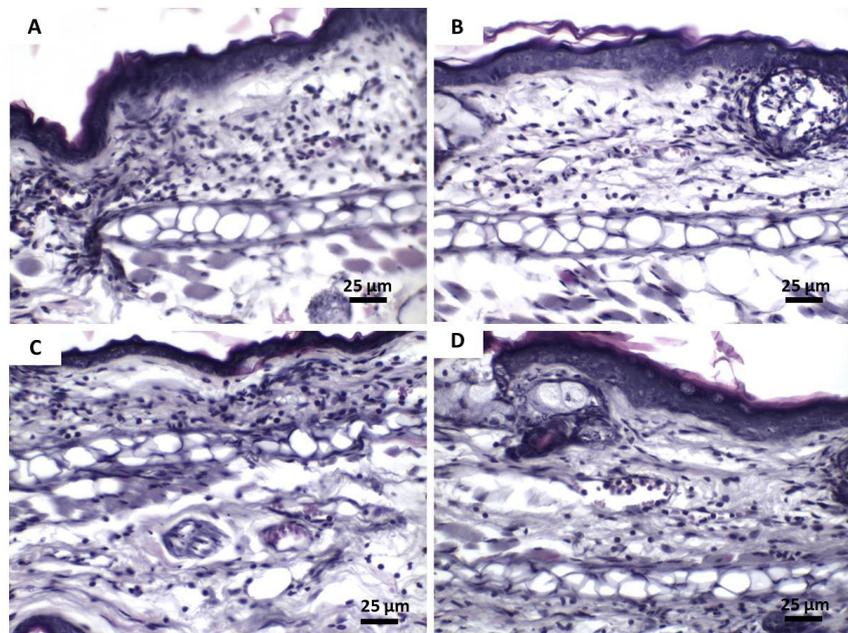


Figura 6. Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-O-tetradecanoiforbol-13-acetato (TPA). Em todas as imagens é possível evidenciar intenso infiltrado inflamatório rico em polimorfonucleares (neutrófilos), caracterizando inflamação aguda.

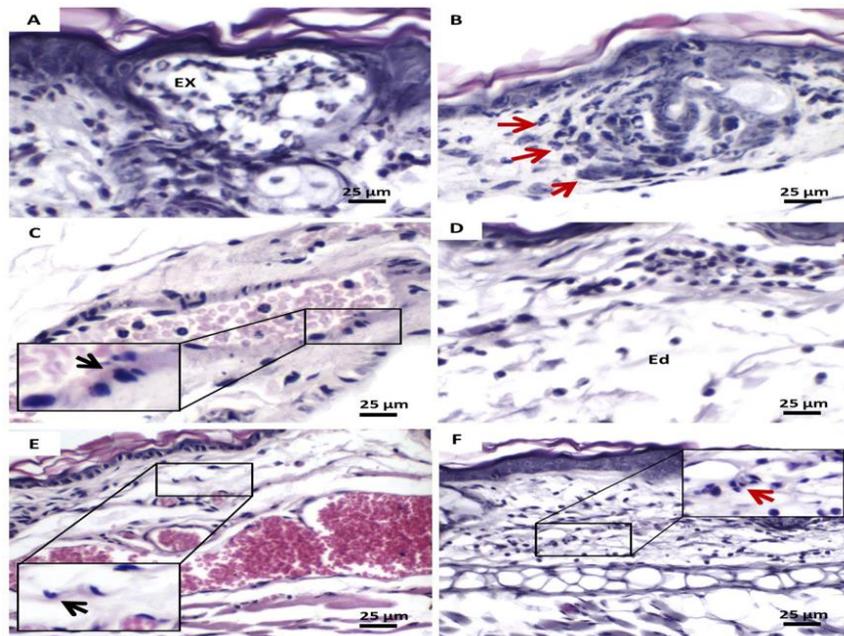


Figura 7. Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, E, F, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). A: intenso infiltrado inflamatório agudo invadindo o tecido epitelial pavimentoso estratificado queratinizado de revestimento, caracterizando exocitose neutrofílica; B: infiltrado inflamatório exibindo distribuição perianexial; C: arteríola exibindo sinais morfológicos de vasculite, com acúmulo de neutrófilos na sua luz; em destaque neutrófilo fazendo diapedese (transmigração); D: tecido conjuntivo fibroso dérmico exibindo intenso edema intersticial; E: capilares dilatados e congestionados (hiperemiados) e neutrófilos viáveis (seta negra) e F: piócitos exibindo fragmentação nuclear (seta vermelha).

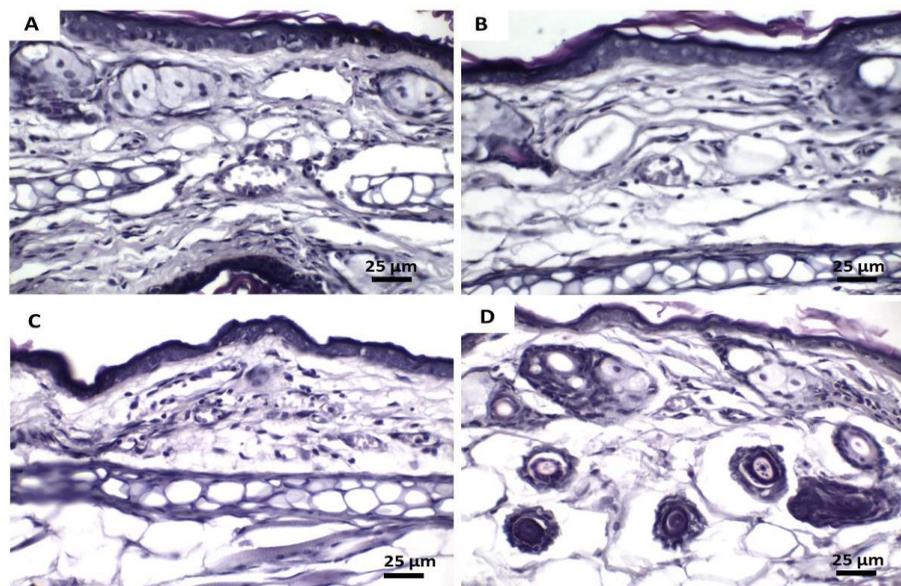


Figura 8. Imagens representativas de cortes histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e submetidas ao tratamento concomitante com extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm). A, B e C: presença de infiltrado inflamatório agudo de menor intensidade no tecido conjuntivo; D: ausência de infiltrado inflamatório em região perianexial.

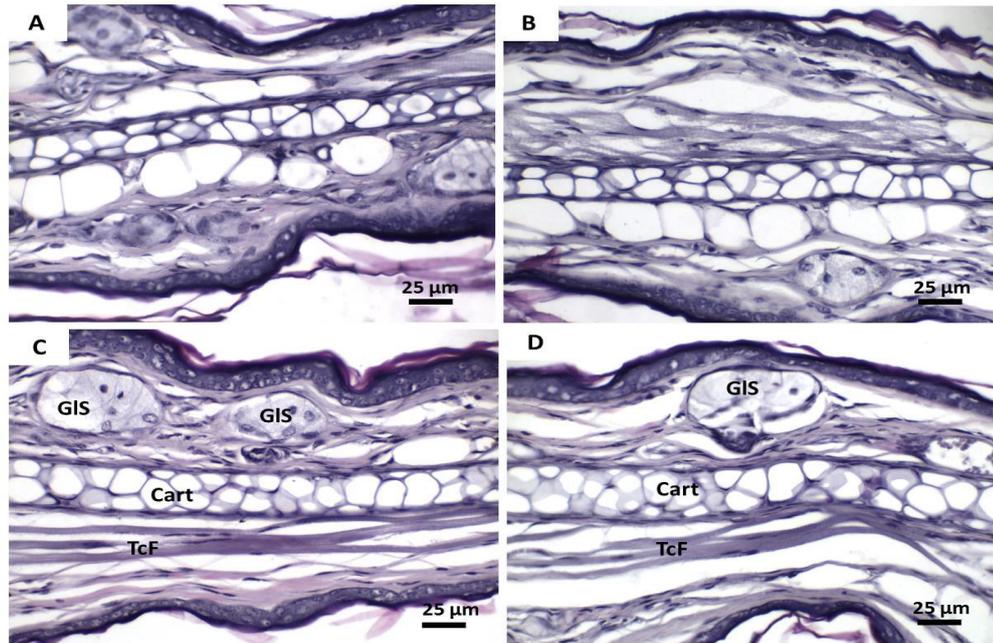


Figura 9. Imagens representativas de corte histológicos (A, B, C, D, aumento de 400x) das orelhas de camundongos inflamadas com 12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e submetidas ao tratamento concomitante com dexametasona. A e B: tecido epidérmico exibindo características histomorfológicas usuais. C e D: mostrando anexos cutâneos, como glândulas sebáceas e folículos pilosos bem preservados, tecido conjuntivo fibroso rico em fibroblastos maduros, com núcleos delgados e alongados e de cromatina densa (fibrócitos).

Também foi avaliado o efeito do extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) nas alterações oxidativas em orelhas de camundongos submetidos a inflamação por TPA. A figura 10 mostra que a administração de TPA aumentou a peroxidação lipídica na orelha ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo acetona. Além disso, a administração concomitante do EHVm, em todas as doses testadas, diminuiu a lipoperoxidação ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo veículo

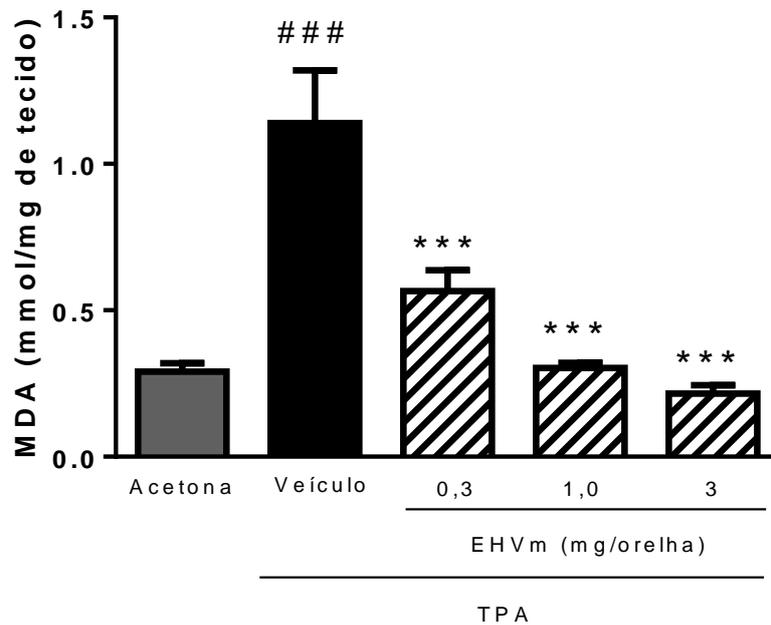


Figura 10. Efeito do extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) na peroxidação lipídica em orelhas de camundongos. Os camundongos foram submetidos a administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), concomitantemente ao tratamento com EHVm. A formação do malondialdeído (MDA) foi mensurada 6 horas após a indução (n=6 animais/grupo). ANOVA de uma via ($F_{(4, 25)} = 18,28$, $p < 0,001$), seguido do teste de Tukey (### $p < 0,001$ vs. grupo acetona; *** $p < 0,001$ vs. grupo tratado com veículo).

Na figura 11 está demonstrado que a administração do TPA diminuiu ($p < 0,001$) o poder antioxidante (FRAP) do tecido quando comparado ao grupo acetona. A administração de EHVm, nas doses de 1 e 3 mg/orelha, aumentou o poder antioxidante no tecido ($p < 0,01$ ou $p < 0,001$ respectivamente, quando comparado ao grupo veículo).

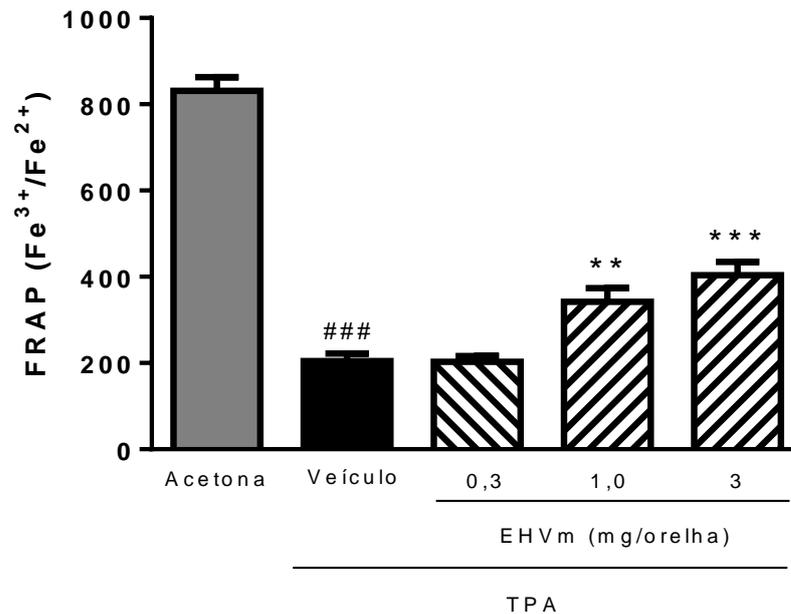


Figura 11. Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico da *Vaccinium macrocarpon* (EHVm) pelo potencial reducional de ferro (FRAP). Os camundongos foram submetidos a administração de 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA), concomitantemente ao tratamento com EHVm. O potencial reducional de ferro (FRAP) foi mensurado 6 horas após a indução (n=6 animais/grupo). ANOVA de uma via ($F_{(4, 25)} = 96,14$, $p < 0,001$), seguido do teste de Tukey (### $p < 0,001$ vs. grupo acetona; ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$ vs. grupo tratado com veículo).

6. DISCUSSÃO

No presente estudo foram apresentados resultados acerca do efeito anti-inflamatório do EHVm. O modelo escolhido para obter estes resultados foi a inflamação de orelha induzida por TPA, que é um modelo útil para a avaliação de compostos com potencial eficácia na terapia anti-inflamatória por via tópica. Esse potente agente flogístico e promotor de tumor é capaz de induzir a inflamação cutânea e hiperproliferação celular em animais, pela formação de produtos da ciclo-oxigenase e lipoxigenase, bem como de histamina e serotonina, dentre outros mediadores (BADILLA, B et al., 2007; FERREIRA, F et al., 2010). Estes mediadores contribuem para a infiltração de neutrófilos, o aumento da permeabilidade vascular e a agregação plaquetária na orelha, que se inicia dentro de 2 horas e se agrava nos tempos posteriores (ZHANG et al., 2007). Uma vantagem deste modelo é a possibilidade de aplicação das substâncias testes por via tópica, o que é importante para o *screening*

de substâncias com atividade anti-inflamatória (BOLLER, 2007). A aplicação por esta via foi utilizada no presente estudo e permitiu observar a modulação da resposta inflamatória pelo EHVm.

Dessa forma, com o uso deste modelo foi possível demonstrar que o EHVm produziu efeito antiedematogênico (Figura 2), mensurado pela redução da massa dos sítios da orelha o que corrobora estudo anterior demonstrando que o tratamento sistêmico com o EHVm diminui o edema pancreático na dose de 200 mg/kg (SANTANA et al.,2018). Concordantemente, foi demonstrado que o tratamento oral com o extrato de frutos de *Vaccinium macrocarpon* reduziu a produção de prostaglandinas *in vitro* e inibiu o edema da pata de camundongos induzido por carragenina (NARDI et al., 2016) e que as frações de extrato de *Vaccinium macrocarpon* com diferentes conteúdos de polifenóis (polifenóis de massa molecular baixa, média ou alta) reduziram a expressão de TNF- α e IL-6 em células de adenocarcinoma de cólon humano (Caco-2) (DENIS et al., 2015).

O edema está relacionado ao aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento de plasma para a região tecidual, fatores que envolvem a modulação da produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, bradicinina, prostaglandinas e citocinas pró-inflamatórias (AKINOSOGLU; GOGOS, 2014). O EHVm possui em sua composição uma expressiva concentração de flavonoides que atuam modulando células envolvidas com a inflamação, inibindo a proliferação de linfócitos T, inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como fosfolipase A₂, ciclo-oxigenase e lipoxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (LÓPEZ R.,et al 2008 ; KIM P., et al 2004). Assim, o efeito antiedematogênico do EHVm certamente é dependente da redução da geração de mediadores inflamatórios como citocinas pró-inflamatórias e pode ser atribuído, ao menos em parte, à ação dos compostos fenólicos presentes neste extrato.

As citocinas também estão envolvidas na migração de leucócitos. Este parâmetro foi avaliado pela medida da atividade de MPO nas orelhas, que foi reduzida pela coadministração do EHVm. Este é um indicativo de inibição da migração de neutrófilos para este tecido, pois a mieloperoxidase é uma enzima presente nos

grânulos azurófilos desta célula e é descrito que os polimorfonucleares podem ser visualizados aderindo-se à parede do vaso em até 6 horas após a aplicação de TPA (DE YOUNG et al, 1989).

Por conseguinte, o tratamento com 1,5% de pó de extrato seco de frutos de *V. macrocarpon* (incorporado na dieta) reduziu a atividade de MPO no cólon de camundongos submetidos a colite induzida por dextrano sulfato de sódio (XIAO et al., 2015), bem como um tratamento profilático com *cranberry* (100 mg/kg) diminuiu a atividade de MPO no coração de ratos submetidos à cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina (ELBERRY et al., 2010). Este efeito antiquimiotático do EHVm poderia resultar da modulação de moléculas de adesão que são representadas pelas selectinas (E, P e L), imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas. As selectinas participam do processo de rolagem, as integrinas do processo de aderência firme e a a transmigração depende de imunoglobulinas como a PECAM-1 (ROBBINS et al., 2000). A expressão dessas moléculas é regulada por fatores como as citocinas pró-inflamatórias (CORLESS J., 2003), fazendo possível que a redução da atividade de MPO esteja correlacionado a inibição da produção de citocinas.

Dentre os diversos mediadores pró-inflamatórios que coordenam a migração celular para o sítio inflamatório inclui-se a IL-1 β (GARIN et al, 2011; XIAO et al., 2015). Interessantemente, foi observada menor concentração de IL-1 β na orelha dos animais estimulados com TPA na presença de EHVm. Infere-se desta maneira, que a administração tópica do extrato de *Vaccinium macrocarpon* tem atuação inibitória sobre a síntese ou liberação desse mediador, liberada por células como macrófagos e linfócitos B. As concentrações séricas de IL-1 β e interferon- γ e a expressão de RNA mensageiro para TNF- α e IL-1 β no cólon foram reduzidas pelo tratamento oral com *cranberry* em camundongos submetidos a colite induzida por dextrano sulfato de sódio (XIAO et al., 2015). Além disso, estudos na doença periodontal mostram redução de parâmetros inflamatórios mediados por tais citocinas no tratamento com *cranberry* (BODET et al., 2006).

Os resultados mostrando efeitos antiedematogênico, antiquimiotático e de redução de IL-1 β são indicativos do efeito anti-inflamatório do EHVm após aplicação tópica. Para amparar estes resultados, foi conduzida a análise histológica. Esta análise corroborou principalmente a redução da resposta inflamatória, uma vez que

como demonstrado na figura 8, a aplicação do TPA concomitante ao EHVm, levou a um infiltrado inflamatório agudo de menor intensidade no tecido conjuntivo e a ausência de infiltrado inflamatório em região perianexial, quando comparado ao grupo tratado apenas com TPA (figura 6 e 7). Os resultados apresentados estão de acordo com os achados do MPO e do edema de orelha aqui demonstrados, uma vez que verificou-se em ambos um menor infiltrado neutrofílico após tratamento com EHVm.

Assim, pode-se inferir que o EHVm diminui características aguda da resposta inflamatória na orelha dos animais, mas os mecanismos envolvidos nestes efeitos precisam ser melhor elucidados. Neste sentido, considerando-se que o EHVm possui compostos com atividade antioxidante (SANTANA et al., 2018), foi proposto que o efeito anti-inflamatório estivesse associado ao efeito antioxidante deste extrato. Em relação a este efeito, o extrato utilizado no presente estudo foi avaliado quanto ao seu efeito antioxidante *in vitro*.

SANTANA et al. (2018) demonstraram que o tratamento com o EHVm nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg reduziu os produtos de peroxidação lipídica, em particular o MDA, em modelo de pancreatite (tecido pancreático), o que também ocorreu no tecido pulmonar. No presente estudo também foi verificado o efeito do EHVm em parâmetros que inferem sobre as alterações oxidativas, para correlacioná-las com o efeito anti-inflamatório. O tratamento concomitante com EHVm levou a diminuição da peroxidação lipídica (figura 10) e aumento do potencial redutor do ferro (figura 11). É interessante observar que apesar das doses de 0,3 e 1 mg/orelha não terem reduzido o edema e a atividade de MPO, estas produziram efeito significativo na peroxidação lipídica (ambas) ou no potencial reducional de ferro (apenas 1 mg/orelha). As razões para estas diferenças não são claras, mas as mesmas indicam que a relação entre as alterações oxidativas e inflamatórias induzidas pelo TPA na orelha podem não ocorrer na mesma magnitude, ou seja, apesar das doses menores diminuírem a lipoperoxidação e o FRAP, isso não resultou em efeito anti-inflamatório mensurável pelos desfechos utilizados neste estudo.

As membranas e organelas celulares contém grande quantidade de lipídios poli-insaturados que podem ser alvos de reações de oxidação, podendo levar a processos de morte celular e inflamação (PIZZIMENTI et al 2010). Não apenas a aplicação de TPA induziu estes processos, mas também a aplicação de EHVm impediu que

peroxidação ocorresse nas orelhas. Os dados encontrados no presente trabalho concordam com trabalhos da literatura, o qual demonstra que o extrato aquoso do *cranberry* apresentou inibição na produção das espécies reativas ao ácido tiobarturico *in vitro* (ABEYWICKRAMA et al., 2016). *In vivo*, observa-se que a administração durante 10 dias do extrato metanólico de *cranberry* nas doses de 50 e 200 mg/kg reduziu a peroxidação lipídica no fígado e que a dose de 200 mg/kg reduziu a lipoperoxidação na pata após injeção de carragenina (NARDI et al., 2016).

A capacidade redutora do ferro, uma avaliação baseada na produção do íon Fe^{2+} (forma ferrosa) a partir da redução do íon Fe^{3+} (forma férrica) presente no complexo 2,4,6- tripiridil-s-triazina (TPTZ) (THAIPONG, et al., 2006), é um parâmetro de importância, pois os íons ferro são muito ativos em reações de óxido-redução, o que os caracteriza como potentes catalisadores das reações de geração de radicais livres, em condições de estresse oxidativo. A participação desses metais se dá, de maneira especial, por meio das reações de Fenton e Haber-Weiss. A primeira é referente à geração de radical OH^{\bullet} , por meio da reação do H_2O_2 com os íons em questão, em seguida, estes íons catalisam a reação entre o H_2O_2 e o radical O_2^{\bullet} , a fim de gerar, da mesma forma, o radical OH^{\bullet} , que por sua vez reage rapidamente com moléculas como lipídeos, proteínas ou bases de DNA (SONEJA et al., 2005). Sendo assim, quanto maior a redução do ferro, menor será o potencial para ocasionar danos celulares.

Em conjunto, os dados que mostram a reversão total (lipoperoxidação) ou parcial (potencial reducional) de alterações oxidativas pelo EHVm indicam que a redução do estresse oxidativo pode ter contribuído para a redução do processo inflamatório. Neste sentido infere-se que os efeitos acima mencionados possam estar associados aos compostos presentes no EHVm. Como demonstrado por PAREDES et al., 2010, o *cranberry* possui em sua composição diversos compostos, entre eles vitaminas, ácidos orgânicos como o ácido málico, quínico, cítrico e benzoico e compostos fenólicos, sendo que a *Vaccinium macrocarpon* é uma das espécies com maior quantidade de compostos fenólicos na sua composição (Szajdek & Borowska, 2008). No EHVm utilizado no presente estudo foram identificados sete compostos (três flavan-3-ols, um flavonol e três antocianinas). Os principais compostos foram catequina e epicatequina. As principais antocianinas foram

cianidina-3-O-glicosídeo, seguido por cianidina-coumaroil-hexosídeo, ambos com íons moleculares característicos de cianidina. O conteúdo total de flavonóides foi de 875,65 mg / 100 g, onde o flavan-3-ol contribuiu com 93,3%, seguido do flavonol (4,3%) e antocianinas (2,4%) (SANTANA et al., 2018).

Tais compostos são considerados responsáveis por conferir as propriedades que o EHVm possui, principalmente as antocianidinas, as proantocianidinas e os flavonóis (Pardo et al., 2017). É mostrado na literatura que este último apresenta significativa ação anti-inflamatória, que pode ser atribuída a sua capacidade de inibir as vias de ciclo-oxigenase e lipoxigenase, as quais desempenham um papel importante na geração de mediadores inflamatórios (YOON et al., 2005). Ademais relata-se também o potencial das antocianinas de inibirem a liberação e síntese de substâncias endógenas, que promovem inflamação como a histamina, TNF- α , IL-1 β e IL-6, entre outras, principalmente pela inibição da ativação da via do NF- κ B (KARLSEN et al., 2007; ABED et al., 2012) e sua capacidade antioxidante, uma vez que estas podem participar na doação de hidrogênio ou elétrons, e também possui radicais intermediários estáveis, que impedem a oxidação (GOBBO. et al., 2007).

De Melo et al. (2009) avaliaram alguns flavonóis individualmente quanto à atividade anti-inflamatória em camundongos (10 mg/kg, via oral) no teste de migração leucocitária induzida por carragenina. Na dose testada, esses flavonoides inibiram a migração leucocitária em até 49,7%. Concomitantemente verificou-se que alguns flavonoides encontrados na planta medicinal *Eleusine indica* (Poaceae), conhecida popularmente como capim pé-de-galinha na dose de 400 μ g/kg reduziram em até 80% o influxo de neutrófilos pulmonares em camundongos expostos a aerossóis de lipopolissacarídeo (LPS), em um modelo que mimetiza a inflamação pulmonar (DE MELO et al., 2005).

Conjuntamente, os resultados obtidos corroboram dados da literatura e sugerem que o extrato da *Vaccinium macrocarpon* possui ação anti-inflamatória por via tópica, derivada provavelmente de sua capacidade em diminuir a migração celular e reduzir a formação de mediadores inflamatórios e atuação na redução das alterações oxidativas. Sendo necessário estudos complementares de toxicidade e possíveis vias alternativas de ação.

7. CONCLUSÃO

Diante dos resultados apresentados foi possível concluir que o *EHVm* possui atividade anti-inflamatória e atenua alterações oxidativas em orelhas de camundongos.

Este fato sugere que o *EHVm* pode ser uma possível alternativa terapêutica futura no tratamento tópico da inflamação, a medida em que novos estudos forem sendo delineados para avaliar a toxicidade deste extrato e mecanismos subjacentes ao seu efeito anti-inflamatório.

8. REFERÊNCIAS

ABED, A. et al. Effect of *Echium amoenum* Fisch. et Mey a Traditional Iranian Herbal Remedy in an Experimental Model of Acute Pancreatitis. **ISRN gastroenterology**, v. 2012, p. 141548, 2012.

ABEYWICKRAMA, Gihan et al. Phenolics of selected cranberry genotypes (*Vaccinium macrocarpon* Ait.) and their antioxidant efficacy. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 49, p. 9342-9351, 2016.

ALBUQUERQUE, Ulysses Paulino de; HANAZAKI, Natália. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. Suppl 0, p. 678-689, 2006

ANHÊ, F. F. A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. **population in the gut microbiota of mice**. **Gut**, v. 64, n. 6, p. 872–83, 2015.

AKINOSOGLOU, K.; GOGOS, C. Immune-modulating therapy in acute pancreatitis: Fact or fiction. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 41, p. 15200–15215, 2014.

ASADI-SAMANI, Majid et al. Medicinal plants with hepatoprotective activity in Iranian folk medicine. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 2, p. 146-157, 2015.

BADILLA B, CAMBRONERO J, CICCIO JF. Determination of topical antiinflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacogn Magazine**. 2007;3(11):139-144.

BADRI, W.; MILADI, K.; NAZARI, Q. A.; et al. Encapsulation of NSAIDs for inflammation management: Overview, progress, challenges and prospects. **International journal of Pharmaceutics**, v. 515, n 1, p, 757-773, 2016.

BÁRTÍKOVÁ, H. et al. Effect of standardized cranberry extract on the activity and expression of selected biotransformation enzymes in rat liver and intestine. **Molecules**, v. 19, n. 9, p. 14948–14960, 2014.

BILATE, AMB. Inflamação, citosinas, proteínas da fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica - vol. 8 - nº 2 - junho de 2007**.

BISWAS, N. et al. Identification of Phenolic Compounds in Processed Cranberries by HPLC Method. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**., v.3, n.1, p.18, 2012.

BODET, C.; CHANDAD, F.; GRENIER, D. Cranberry components inhibit interleukin-6, interleukin-8, and prostaglandin E2 production by lipopolysaccharide-activated gingival fibroblasts. **European Journal of Oral Sciences**, v. 115, n. 1, p. 64–70, 2007.

BODET, C. C., PICHÉ, M., CHANDAD, F., & GRENIER, D. Inhibition of periodontopathogen-derived proteolytic enzymes by a high-molecular-weight fraction isolated from cranberry. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 57(4), 685–690 (2006).

BOLLER, S. Atividade anti-inflamatória tópica do extrato e compostos isolados da *Baccharis illinita* DC. (Asteraceae) em camundongos. 2007. 69 p. **Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.**

BONFIM, R.R. et al. Isopropoxy-carvacrol, a derivative obtained from carvacrol, reduces acute inflammation and nociception in rodents. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, n. 3, p. 237-243, 2014.

BOSE, R.; SUTHERLAND, G.R.; PINSKY, C. Biological and methodological implications of prostaglandin involvement in mouse brain lipid peroxidation measurements. *Neurochemical Research*, v. 14, n. 3, p. 217-220, 1989.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brasília: Ministério da Saúde**, 2006.

CAMARGO, E.A. et al. Role of substance P and bradykinin in acute pancreatitis induced by secretory phospholipase A2. **Pancreas**, v. 37, n. 1, p. 50-55, 2008.

CHAMUSCA, F.V; REIS, S.R.A; LEMAIRE, D; MEDRADO, A.P. Mediadores do efeito sistêmico do processo inflamatório e terapias fotobiomoduladoras: uma revisão de literatura. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas, Salvador**, v.11, n.1, p.70-78, jan. /abr. 2012.

CHANDRASEKHARAN, J. A SHARMA-WALIA N. Lipoxins; nature`s way to resolve inflammation **journal of inflammation research**, v. 8 p.181-192,2015.

CHIBLI, L. A.; RODRIGUES, K. C.; GASPARETTO, C. M.; PINTO, N. C.; FABRI, R. L.; SCIO, E.; ALVES, M. S.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUZA, O. V. Antiinflammatory effects of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Oken ethanol extract in acute and chronic cutaneous inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, 2014.

CORLESS J.The aetiology and epidemiology of chronic obstructive pulmonary disease. In: Pearson M, Wedzicha W. Chronic obstructive pulmonary disease. Critical debates. **Massachusetts: Blackwell Science**; 2003. p.1-16.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; SILVA, N. P. da; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

DE FREITAS JUNIOR, Luciano Mamede; DE ALMEIDA JR, Eduardo B. Medicinal plants for the treatment of obesity: ethnopharmacological approach and chemical and biological studies. **American journal of translational research**, v. 9, n. 5, p. 2050, 2017.

DE MELO, G. O.; MALVAR, D. C.; VANDERLINDE, F. A.; ROCHA, F. F.; PIRES, P. A.; COSTA, E. A.; DE MATOS, L. G.; KAISER, C. R.; COSTA, S. S. J. Antinociceptive and anti-inflammatory kaempferol glycosides from *Sedum dendroideum* **Ethnopharmacol.** 2009, 124, 228.

DE MELO, G. O.; MUZITANO, M. F.; LEGORA-MACHADO, A.; ALMEIDA, T. A.; DE OLIVEIRA, D. B.; KAISER, C.R.; KOATZ, V. L. G.; COSTA, S. S.C- glycosylflavones from the aerial parts of *Eleusine indica* inhibit LPS-induced mouse lung inflammation. **Plant Medicine.** 2005, 71, 362.

DENIS, M.-C. et al. Prevention of oxidative stress, inflammation and mitochondrial dysfunction in the intestine by different cranberry phenolic fractions. **Clinical science**, v. 128, n. 3, p. 197–212, fev. 2015.

DINH, J. et al. Cranberry extract standardized for proanthocyanidins promotes the immune response of *Caenorhabditis elegans* to *Vibrio cholerae* through the p38 MAPK pathway and HSF-1. **PLOS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–11, 2014.

DURHAM, S. H.; STAMM, P. L.; EILAND, L. S. Cranberry Products for the Prophylaxis of Urinary Tract Infections in Pediatric Patients. **The Annals of pharmacotherapy**, v. 49, n. 12, p. 1349–1356, dez. 2015.

DUTRA, RAFAEL C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

ELBERRY, A. A. et al. Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Food and chemical toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1178–1184, maio 2010.

FERREIRA F.S; SARAIVA B.R.A; ARARUNA M.K.A; MENEZES I.R.A; COSTA J.G.M; COUTINHO H.D.M, et al. Topical anti-inflammatory activity of body fat from the lizard *Tupinambis merianae*. **Journal Ethnopharmacol.** 2010;130(3):514–520. Doi: 10.1016/j.jep.2010.05.041

FULLERTON, J. N.; GILROY, D. W. RESOLUTION OF inflammation; a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 8 p. 551-67, 2016.

GARIN, A.; PROUDFOOT, A.E. Chemokines as targets for therapy. **Experimental cell research**, v. 317, n. 5, p. 602-612, 2011.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M.B. Review of anti-inflammatory herbal medicines. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2016, 2016

GLISAN, S. L. et al. Cranberry extract attenuates hepatic inflammation in high-fat-fed obese mice. **The Journal of nutritional biochemistry**, v. 37, p. 60–66, nov. 2016.

GOBBO-NETO, Leonardo; LOPES, Norberto P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 374, 2007.

HAMILTON, K. et al. Standardized cranberry capsules for radiation cystitis in prostate cancer patients in New Zealand: a randomized double blinded, placebo controlled pilot study. **Supportive Care in Cancer**, v. 23, n. 1, p. 95–102, 2014.

HARVEY AL, EDRADA-EBEL R, QUINN RJ. ;1; The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews Drug discovery** 2015;14:111-129.

HISANO, M. et al. Cranberries and lower urinary tract infection prevention. **Clinics**, v. 67, n. 6, p. 661–668, 2012.

JÚNIOR JOL, SERRANO SC, TEODORO AL, DANA BA. Os anti-inflamatórios não hormonais. **Prática hospitalar** 2007; 51: 173-8

KARLSEN, A. et al. Anthocyanins inhibit nuclear factor-kappaB activation in monocytes and reduce plasma concentrations of pro-inflammatory mediators in healthy adults. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 8, p. 1951–4, 2007.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, H. W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of. Pharmacological. Science**. 2004, 96, 229

KOWALSKA, K.; OLEJNIK, A. Beneficial effects of cranberry in the prevention of obesity and related complications: Metabolic syndrome and diabetes - A review. **Journal of Functional Foods**, 20, 171–181(2016).

KRESTY, L.A. et al. MicroRNA alterations in Barrett's esophagus, esophageal adenocarcinoma, and esophageal adenocarcinoma cell lines following cranberry extract treatment: Insights for chemoprevention. **Journal Carcinogenesis**, 2011.

LAPA, A.J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5.ed. São Paulo: Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, **UNIFESP/EPM**, 2007. 119 p

LAWRENCE, T, GILROY, D. W. Chonic inflammation; a failure of resolution? **International jornal of experimental pathology**, v.88, n 2, p. 85-94, 2007.

LIMA, RR; COSTA, AMR; SOUZA, RD; GOMESLEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista de Medicina. [online]**. 2007, vol.21, n.2, pp. 29-34.

LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; DE MEDINA, F. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical. Pharmacology**. 2008, 76, 495.

MARTÍN, M; RAMOS,S; MATEOS,R; MARAIS, J; BRAVO-CLEMENTE,L ; KHOO,C; GOYA, L. Chemical characterization and chemo-protective activity of cranberry

phenolic powders in a model cell culture. Response of the antioxidant defenses and regulation of signaling pathways. **Food Research International**, 71, 68–82 (2015).

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: **New Adventures of an Old Flame**. **Cell** 140, March 19, 2010. Elsevier Inc.

MUTLU, H.; EKINCI, Z. Urinary tract infection prophylaxis in children with neurogenic bladder with cranberry capsules: randomized controlled trial. **ISRN Pediatrics**, p.4, 2012

NARDI, Geisson Marcos et al. Anti-inflammatory activity of berry fruits in mice model of inflammation is based on oxidative stress modulation. **Pharmacognosy research**, v. 8, n. Suppl 1, p. S42, 2016.

NORLING, L. V., SERHAN, C. N. Profiling in resolving inflammatory exudates identifies novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators and signals for termination. **Journal Intern Medicine**. 268, 15–24.(2010)

NOVOTNY, J. A. et al. Cranberry juice consumption lowers markers of cardiometabolic risk, including blood pressure and circulating C-reactive protein, triglyceride, and glucose concentrations in adults. **The Journal of nutrition**, v. 145, n. 6, p. 1185–93, 2015.

OLIVEIRA, Alan Santos et al. Atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do extrato etanólico de *Leonurus sibiricus* L.(Lamiaceae). 2017.

OLIVEIRA S.G.D; MOURA F.R.R; DEMARCO F.F; NASCENTE O.S; DELPINO F.A.B; LUND R.G. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal Ethnopharmacol** 2012; 140(2):428-437

PARDO-MATES, N., VERA, A., BARBOSA, S., HIDALGO-SERRANO, M., NÚÑEZ, O., SAURINA, J., PUIGNOU, L. Characterization, classification and authentication of fruit-based extracts by means of HPLC-UV chromatographic fingerprints, polyphenolic profiles and chemometric methods. **Food Chemistry**, 221, 29–38.033,(2017).

PAREDES-LÓPEZ, O., CERVANTES-CEJA, M. L., VIGNA-PÉREZ, M., & HERNÁNDEZ-PÉREZ, T. Berries: Improving Human Health and Healthy Aging, and Promoting Quality Life-A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 65(3), 299–308.(2010).

PIZZIMENTI, STEFANIA et al. The " two-faced" effects of reactive oxygen species and the lipid peroxidation product 4-hydroxynonenal in the hallmarks of cancer. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 338-363, 2010.

PRASAIN, J.K. et al. Effect of cranberry juice concentrate on chemically-induced urinary bladder cancers. **Oncology Reports**., v.19, n.6, p.1565-1570, 2008.

RAHMATI M, MOBASHERI A, MOZAFARI M,.Inflammatory mediators in osteoarthritis: A critical review of the state-of-the art, current porspects, and future challenges, **Bone**.81-90,2016.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.

SAH, R. P.; DAWRA, R. K.; SALUJA, A. K. New insights into the pathogenesis of pancreatitis. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 5, p. 523–530, 2013.

SANTANA, D. G; OLIVEIRA, A. S; SOUZA, M. T; CARMO, J. T; et al. Vaccinium macrocarpon Aiton Extract Ameliorates Inflammation and Hyperalgesia through Oxidative Stress Inhibition in Experimental Acute Pancreatitis.**Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2018.

SAONA, C.R. et al. Tracing the history of plant traits under domestication in cranberries: potential consequences on antiherbivore defences. **Journal Experimental Botany**, v.62, n.8, p.26332644, 2010.

SILVA, N.M; DE OLIVEIRA F.C; PEREIRA, A.F. Influência do uso de Cranberry na saúde sistêmica e bucal/Influence of the use of cranberry in systemic and oral health. **Revista de Pesquisa em Saúde**, v. 16, n. 1, 2015.

SKROVANKOVA, S., SUMCZYNSKI, D., MLCEK, J., JURIKOVA, T., & SOCHOR, J.. Bioactive compounds and antioxidant activity in different types of berries. **International Journal of Molecular Sciences**, 16(10), 24673–24706 (2015).

SONEJA, Amit; DREWS, Magdalena; MALINSKI, Tadeusz. Role of nitric oxide, nitroxidative and oxidative stress in wound healing. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 108, 2005.

STOTHERS, L. A randomized trial to evaluate effectiveness and cost effectiveness of naturopathic cranberry. **Canadian Journal Urology**, v.9, n.3, p.1558-1562, 2002.

SZAJDEK, A., & BOROWSKA, E. J. Bioactive compounds and health-promoting properties of Berry fruits: **A review. Plant Foods for Human Nutrition**, 63(4), 147–153 (2008).

TENÓRIO, PP; DUQUE, MAA; ARAÚJO, MM; FILHO, NTP; MELO JÚNIOR, MR. O papel das metaloproteinases no desenvolvimento do aneurisma de aorta. **Revista para Medicina**; 26(4), out. - dez. 2012.

THAIPONG, Kriengsak et al. Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. **Journal of food composition and analysis**, v. 19, n. 6, p. 669-675, 2006

VALENTOVAÃ, K.I. et al. Bioseguridad, estado de antioxidante, y metabolismos en la orina después del consume de jugo de cranberry secado, en mujeres sanas: una prueba piloto dobleciego placeno controlado. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v.55, n.8, p.3217-3224,2007.

XIAO, X., KIM, J., SUN, Q., KIM, D., PARK, C.-S., LU, T.-S., & PARK, Y. Preventive effects of cranberry products on experimental colitis induced by dextran sulphate sodium in mice. **Food Chemistry**, 2015, 438–446

YOON, J. H.; BAEK, S. J. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**. 2005, 46, 585.

YOUNG, J. M.; DE YOUNG, L. M. Cutaneous models of inflammation for the evaluation of topical and systemic pharmacological agents. **Pharmacological methods in the control of inflammation**, p. 215-231, 1989.

ZHANG, B.; LI, J. B.; ZHANG, D. M.; DING, Y.; DU, G. H. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 3, p. 465-69, 2007.

ANEXO A



CERTIFICADO (2º VIA)

Certificamos que a proposta intitulada “**Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante do extrato de cranberry (vaccinium macrocarpon)**”, registrada com o nº **66/2017**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. Enilton Aparecido Camargo** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), 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 de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) da Universidade Federal de Sergipe, em reunião de **15/01/2018**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	Início:02/2018, Término: 12/2019
Espécie/linhagem/raça	Camundongo heterogênico
Nº de animais	704
Peso/Idade	20-30g / 2-3 meses
Sexo	M
Origem	Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia



 Prof. Dr. JOSEMAR SENA
 BATISTA
 Coordenador do CEPA/UFS