

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE  
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA  
DOUTORADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**LUANA MENDONÇA CERCATO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO ASSOCIADO À ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Annona muricata* L.**

**ARACAJU  
2021**

**LUANA MENDONÇA CERCATO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO ASSOCIADO À ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Annona muricata* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

**Orientador:** Prof. Dr. Enilton A. Camargo

**ARACAJU  
2021**

**LUANA MENDONÇA CERCATO**

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO TÓPICO ASSOCIADO À ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Annona muricata* L.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

---

**Orientador: Prof. Dr. Enilton A. Camargo  
Universidade Federal de Sergipe**

---

**1º Examinador: Profa. Dra. Ivani Aparecida de Souza  
Universidade Federal de Sergipe**

---

**2º Examinador: Profa. Dra. Elma Regina Silva de Andrade Wartha  
Universidade Federal de Sergipe**

---

**3º Examinador: Profa. Dra. Sandra Lauton Santos  
Universidade Federal de Sergipe**

---

**4º Examinador: Profa. Dra. Paula dos Santos Nunes  
Universidade Estadual de Campinas**

**ARACAJU  
2021**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

C412e Cercato, Luana Mendonça  
Efeito anti-inflamatório tópico associado à atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L. / Luana Mendonça Cercato ; orientador Enilton Aparecido Camargo. – Aracaju, 2021.  
73f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2021.

1. Ciências da saúde. 2. Inflamação. 3. Estresse oxidativo. 4. Plantas medicinais. 5. Graviola. 6. Flavonoides. I. Camargo, Enilton Aparecido, orient. II. Título.

CDU 616-002

## RESUMO

**Efeito anti-inflamatório tópico associado à atividade antioxidante do extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L. Luana Mendonça Cercato, 2021.** A *Annona muricata* L., também conhecida como “graviola”, é utilizada popularmente para o tratamento de doenças relacionadas a processos inflamatórios e oxidativos. Além disso, a literatura científica investiga os potenciais efeitos biológicos de diversas partes desta planta medicinal. No entanto, o efeito anti-inflamatório do extrato aquoso das suas folhas por via de administração tópica ainda precisa ser mais bem avaliado. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o efeito da aplicação tópica do extrato aquoso das folhas da *A. muricata* L. (EAAM) em um modelo agudo de inflamação cutânea e avaliar o papel da sua atividade antioxidante. Experimentos *in vitro* foram realizados para quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais; caracterização dos compostos fenólicos por CLAE; ensaios de capacidade antioxidante do EAAM (12,5; 25; 50; 100 e 200 µg/mL) por eliminação dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e óxido nítrico (NO), inibição da peroxidação lipídica e análise do potencial redutor de ferro (FRAP). Além disso, foram desenvolvidos, em fibroblastos da linhagem L929, testes de viabilidade celular e de liberação de espécies reativas de oxigênio (ERO). Em experimentos *in vivo*, após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da UFS (nº 9256010719), foi avaliada a atividade anti-inflamatória tópica do EAAM (0,3; 1 e 3 mg/orelha) no modelo de inflamação de orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA; 1 µg/orelha) em camundongos Swiss machos. O EAAM foi administrado nas doses de 0,3; 1 ou 3 mg/orelha, 5 min após o TPA. Como tratamento padrão foi utilizada a dexametasona (0,05 mg/orelha). Após 6 horas, foi mensurado o edema de biópsias da orelha, a atividade de mieloperoxidase (MPO), alterações histológicas, hidroperóxidos totais e atividade de catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD). Os resultados foram expressos em média ± EPM e a avaliação estatística dos dados foi realizada usando ANOVA de uma via seguida pelo teste de Tukey, com  $p < 0,05$  considerado significativo. A quantidade de fenólicos totais no EAAM foi de  $164,52 \pm 1,13$  mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato e a quantidade de flavonoides totais foi de  $77,02 \pm 0,01$  mg de equivalente de catequina/g de extrato. Na análise por CLAE foram identificados cinco compostos fenólicos: quercetina 3-glicosídeo, rutina, ácido clorogênico, catequina e ácido gálico. Nos ensaios antioxidantes, observou-se redução do radical DPPH ( $IC_{50} = 97,1$  µg/mL) e NO ( $IC_{50} = 44,1$  µg/mL), bem como o aumento da capacidade redutora de ferro e redução da peroxidação lipídica basal ( $IC_{50} = 122,8$  µg/mL) e induzida ( $IC_{50} = 401,5$  µg/mL). Em fibroblastos L929, o EAAM não alterou a viabilidade celular, porém reduziu a liberação de ERO ( $p < 0,01$ ). Por via tópica, o tratamento com EAAM promoveu redução do edema de orelha ( $p < 0,001$ ; 1 e 3 mg/orelha), da atividade de mieloperoxidase ( $p < 0,001$ ; 1 e 3 mg/orelha) e de parâmetros histológicos inflamatórios, representados pelo menor número de leucócitos ( $p < 0,001$ ; 3 mg/orelha) e menor espessura da derme ( $p < 0,001$ ; 3 mg/orelha) comparados ao grupo veículo. Além disso, foi observada a redução de hidroperóxidos totais ( $p < 0,05$ ) e da atividade da CAT ( $p < 0,05$ ; 3 mg/orelha), porém não houve alteração da atividade da SOD. Dessa forma, estes resultados indicam o potencial efeito anti-inflamatório tópico da *A. muricata* L. e sugerem seus efeitos à sua capacidade antioxidante, provavelmente pela ação de compostos fenólicos presentes no extrato.

**Descritores:** Inflamação. Estresse oxidativo. Planta medicinal. *Annona muricata* L. Flavonoides.

## ABSTRACT

**Topical anti-inflammatory effect associated with the antioxidant activity of the aqueous extract of the leaves of *Annona muricata* L.** Luana Mendonça Cercato, 2021. *Annona muricata* L., also known as "soursop", is popularly used to treat diseases related to inflammatory and oxidative processes. In addition, the scientific literature investigates the biological effects of different parts of this medicinal plant. However, the anti-inflammatory effect of the aqueous extract of its leaves via topical administration still needs to be better elucidated. In this context, the objective of this study was to investigate the effect of topical application of the aqueous extract of the leaves of *A. muricata* L. (AEAM) in acute model of skin inflammation and evaluation of the role of its antioxidant activity. *In vitro* experiments were performed to quantify total phenolic compounds and flavonoids; characterization of phenolic compounds by HPLC; AEAM antioxidant capacity tests (12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL) by eliminating the radicals 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) and nitric oxide (NO), inhibition of lipidic peroxidation and analysis of the iron-reducing potential (FRAP). In addition, cell viability and the release of reactive oxygen species (ROS) tests were developed in L929 fibroblasts. In the *in vivo* experiments, after the approval of the Animal Research Ethics Committee at UFS (nº 9256010719), the topical anti-inflammatory activity of AEAM (0.3, 1 and 3 mg/ear) was evaluated in the model of ear edema induced by 12-O-tetradecanoil-phorbol-13-acetate (TPA) (1 µg/ear, vehicle) in male Swiss mice. Dexamethasone (0.05 mg/ear, control) was used as a standard treatment. After 6 hours, the edema of ear biopsies, myeloperoxidase activity (MPO), histological changes and oxidative parameters were measured. The results were expressed as mean ± SEM and the statistical evaluation of the data was performed using one-way ANOVA followed by the Tukey test, with  $p < 0.05$  considered significant. The amount of total phenolics in the EAAM was  $164.52 \pm 1.13$  mg of gallic acid equivalent/g of extract and the amount of total flavonoids was  $77.02 \pm 0.01$  mg of catechin equivalent/g of extract. In the HPLC analysis, five phenolic compounds were identified: quercetin 3-glycoside, rutin, chlorogenic acid, catechin and gallic acid. In antioxidant tests, we observed a reduction in the DPPH radical ( $IC_{50} = 97.1$  µg/mL) and NO ( $IC_{50} = 44.1$  µg/mL), as well as an increase in the iron-reducing potential and reduction of spontaneous ( $IC_{50} = 122.8$  µg/mL) and induced ( $IC_{50} = 401.5$  µg/mL) lipid peroxidation. In L929 fibroblasts, AEAM did not alter cell viability, but it reduced ROS release ( $p < 0.01$ ). Topical treatment with EAAM promoted a decrease in ear edema ( $p < 0.001$ ; 1 and 3 mg/ear), myeloperoxidase activity ( $p < 0.001$ ; 1 and 3 mg/ear) and inflammatory histological parameters, represented by the lower number of leukocytes ( $p < 0.001$ ; 3 mg/ear) and lesser dermis thickness ( $p < 0.001$ ; 3 mg/ear) compared to the vehicle group. In addition, a reduction in total hydroperoxides ( $p < 0.05$ ) and modulation of catalase ( $p < 0.05$ ; 3 mg/ear) was observed, but there was no change in the enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD). Thus, these results indicate a potential topical anti-inflammatory effect of *A. muricata* L. associated with the antioxidant capacity suggested by the action of phenolic compounds present in the aqueous extract of its leaves.

**Descriptors:** Inflammation. Oxidative stress. Medicinal plant. *Annona muricata* L. Flavonoids.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> - Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso das folhas da <i>Annona muricata</i> L.....	41
---	----

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Migração celular durante o processo inflamatório agudo.....	15
<b>Figura 2</b> - Planta <i>Annona muricata</i> L. Painéis A: planta inteira, B: folhas, C: flor, D: fruto e E: sementes. ....	20
<b>Figura 3</b> - Estrutura química dos polifenóis.....	24
<b>Figura 4</b> - Principais subclasses de flavonoides.....	25
<b>Figura 5</b> - Delineamento experimental.....	29
<b>Figura 6</b> - Análise do extrato aquoso das folhas da <i>Annona muricata</i> L. por cromatografia líquida de alta performance ( $\lambda = 280$ nm).....	41
<b>Figura 7</b> - Atividade antioxidante <i>in vitro</i> do extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM). ....	43
<b>Figura 8</b> - Viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados com extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM).....	44
<b>Figura 9</b> - Liberação de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos L929 tratados com extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM).....	45
<b>Figura 10</b> - O extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM) reduz a inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) na orelha de camundongos....	46
<b>Figura 11</b> - Imagens representativa de alterações histopatológicas em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM).....	48
<b>Figura 12</b> - O extrato aquoso de folhas de <i>Annona muricata</i> L. (EAAM) reduz número de células inflamatórias e espessura da derme em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA). ....	49
<b>Figura 13</b> - Concentração de hidroperóxidos totais em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM). ....	50
<b>Figura 14</b> - Atividade de enzimas antioxidantes em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM).....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ANOVA** - análise de variância

**CAT** - catalase

**CLAE** - cromatografia líquida de alta eficiência

**COX** – ciclo-oxigenase

**DPPH** - radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

**EAAM** - extrato aquoso das folhas de *Annona muricata*

**ERO** - espécies reativas de oxigênio

**FRAP** - atividade antioxidante de redução férrica

**IL-1 $\beta$**  - interleucina 1 $\beta$

**IL-6** - interleucina 6

**MPO** - mieloperoxidase

**MTT** - metil-tiazolil-tetrazolium

**NADPH** - fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamina (do inglês *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*)

**NO** - Óxido nítrico (do inglês *nitric oxide*)

**O $^{\cdot-}_2$**  - radicais superóxido

**OH $\cdot$**  - radicais hidroxil

**OONO $^{\cdot-}$**  - peróxido nitrito

**SOD** - enzima superóxido dismutase

**TBARS** - substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico

**TNF- $\alpha$**  - Fator de necrose tumoral-  $\alpha$  (do inglês *tumoral necrosis factor- $\alpha$* )

**TPA** - acetato de 12-O-tetradecanoilforbol (do inglês *12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate*)

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>11</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
<b>2.1 Inflamação</b> .....	<b>13</b>
<b>2.2 Estresse oxidativo</b> .....	<b>16</b>
<b>2.3 <i>Annona muricata</i> L.</b> .....	<b>20</b>
<b>2.4 Compostos fenólicos e flavonoides</b> .....	<b>23</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>3.1 Geral</b> .....	<b>27</b>
<b>3.2 Específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>28</b>
<b>4.1 Coleta e identificação da planta</b> .....	<b>28</b>
<b>4.2 Preparo do extrato aquoso da <i>Annona muricata</i> L. (EAAM)</b> .....	<b>28</b>
<b>4.3 Delineamento experimental</b> .....	<b>28</b>
<b>4.4 Quantificação de compostos fenólicos totais no EAAM</b> .....	<b>29</b>
<b>4.5 Quantificação de flavonoides totais do EAAM</b> .....	<b>30</b>
<b>4.6 Caracterização de compostos fenólicos por CLAE</b> .....	<b>30</b>
<b>4.7 Avaliação da capacidade antioxidante do EAAM <i>in vitro</i></b> .....	<b>31</b>
4.7.1 Atividade antioxidante do EAAM por eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) .....	31
4.7.2 Atividade antioxidante do EAAM por eliminação do óxido nítrico (NO) .....	32
4.7.3 Atividade antioxidante do EAAM pelo potencial redutor de ferro (FRAP) .....	32
4.7.4 Atividade antioxidante do EAAM pela inibição da peroxidação lipídica basal e induzida. ....	33
<b>4.8 Avaliação da viabilidade celular em fibroblastos L929</b> .....	<b>33</b>
<b>4.9 Avaliação da liberação de ERO em fibroblastos L929</b> .....	<b>34</b>
<b>4.10 Avaliação da capacidade anti-inflamatória e antioxidante <i>in vivo</i></b> .....	<b>34</b>
4.10.1 Animais de experimentação .....	34
4.10.2 Modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA).. ....	35
4.10.3 Determinação do edema das orelhas .....	36
4.10.4 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas biópsias das orelhas .....	36
4.10.5 Análise histológica das orelhas .....	36

4.10.6	Quantificação de hidroperóxidos totais .....	37
4.10.7	Determinação da atividade da enzima catalase .....	38
4.10.8	Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD).....	38
<b>4.11</b>	<b>Análise estatística .....</b>	<b>38</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>40</b>
<b>5.1</b>	<b>Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais do EAAM .....</b>	<b>40</b>
<b>5.2</b>	<b>Caracterização de compostos fenólicos por CLAE.....</b>	<b>40</b>
<b>5.3</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante do EAAM <i>in vitro</i> .....</b>	<b>42</b>
<b>5.4</b>	<b>Avaliação da viabilidade celular e da liberação de ERO em fibroblastos L929 .....</b>	<b>43</b>
<b>5.5</b>	<b>Avaliação de efeito anti-inflamatório do EAAM <i>in vivo</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>5.6</b>	<b>Avaliação da atividade antioxidante do EAAM <i>in vivo</i>.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE .....</b>	<b>70</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>72</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação aguda é um processo fisiológico de defesa do organismo contra patógenos ou agentes lesivos que pode durar de minutos a dias, e envolve eventos como o extravasamento de proteínas plasmáticas e/ou fluidos e a migração de leucócitos para uma área extravascular lesionada e/ou infectada (REUTER et al., 2010). Essas reações celulares e vasculares são mediadas por fatores químicos produzidos nas células teciduais, endoteliais ou no plasma e estão relacionados ao desenvolvimento dos sintomas clínicos clássicos de inflamação: edema, rubor, dor, calor e perda de função (MITTAL et al., 2014; VARELA et al., 2018).

Na resposta inflamatória, leucócitos, macrófagos e outras células teciduais residentes nas regiões afetadas estão associados a uma “explosão respiratória” que ocorre como resultado de uma captação aumentada de oxigênio, e esta por sua vez leva a uma excessiva produção e liberação de espécies reativas de oxigênio (REUTER et al., 2010; MITTAL et al., 2016). As células inflamatórias ativas geram mediadores inflamatórios solúveis, como citocinas, quimiocinas e derivados do ácido araquidônico, que atuam atraindo mais células inflamatórias para a área lesionada, liberando ainda mais espécies reativas. Esses marcadores essenciais também podem estimular cascatas de transdução de sinal e alterar fatores de transcrição, que por sua vez medeiam importantes reações de estresse celular (VARELA et al., 2018; ZUO et al., 2019). Nesse contexto, o estresse oxidativo merece atenção, devido seu potencial em prejudicar células saudáveis do estroma e células epiteliais vizinhas, alterações que a longo prazo podem desencadear outros processos patológicos como gastrite, diabetes, câncer e dermatites (MITTAL et al., 2014; ZUO et al., 2019).

Estudos científicos mostram que os produtos naturais, incluindo plantas ricas em compostos fenólicos, apresentam benefícios significativos para a saúde, dentre eles, efeitos cardioprotetores, antidiabéticos, gastroprotetores e anticarcinogênicos (AROLA-ARNAL et al., 2019; HUANG; LU; DING, 2021; MAHOMOODALLY et al., 2020). Em trabalho de revisão recente, Malekia, Crespob e Cabanillas (2019) ressaltam a importância da utilização desses compostos antioxidantes provenientes de plantas medicinais como potencial alternativa preventiva e terapêutica contra patologias relacionadas à processos inflamatórios.

Neste contexto, a espécie vegetal *Annona muricata* L., conhecida como *soursop* ou graviola, tem se destacado devido ao seu uso popular para o controle de muitos processos patológicos. Partes da *A. muricata*, incluindo frutas, sementes, raízes, caule e folhas são tradicionalmente usadas como agentes antiparasitário, anti-hipertensivo, analgésico, anti-inflamatório, antidiabético e anticâncer (CORIA-TELLEZ et al., 2018; GAVAMUKULYA et al., 2017; WAHAB et al., 2018).

Seus efeitos antioxidante e anti-inflamatório têm sido explorados na literatura em virtude dos constituintes fitoquímicos presentes nas suas folhas, uma vez que alguns compostos fenólicos, dentre eles flavonoides, foram identificados nesta planta (MOGHADAMTOUSI et al., 2015). O trabalho de Quilez e colaboradores (2015) demonstrou efeito anti-inflamatório tópico induzido pelo extrato aquoso das folhas da *A. muricata* em modelo animal de inflamação cutânea, evidenciado com a redução do edema de orelha e a inibição da atividade da enzima mieloperoxidase, porém os possíveis mecanismos de ação para esse efeito não foram explorados.

A potencial aplicabilidade tópica das folhas da graviola também foi demonstrada em modelo de cicatrização em feridas de ratos, no qual o aumento da capacidade antioxidante promovido pelo extrato etanólico foi determinante para a aceleração do processo de cicatrização das feridas (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Dessa forma, diante do uso tradicional, da presença de fitoquímicos antioxidantes e dos estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos expostos na literatura científica para esta espécie vegetal e frente a necessidade de novas terapias farmacológicas anti-inflamatórias tópicas bem como dos seus mecanismos de ação envolvidos, é relevante considerar o potencial antioxidante da *Annona muricata* L. e a sua relação protetora diante da inflamação cutânea.

Nesse sentido, a hipótese deste estudo é a de que a aplicação tópica do extrato aquoso das folhas da *A. muricata* (EAAM) em um modelo agudo de inflamação cutânea pode produzir efeitos protetores e possivelmente a redução do estresse oxidativo pode contribuir para esta proteção.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico que consiste na resposta orgânica diante de lesão tecidual ou infecção, envolvendo uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido lesado (WARD, 2010). Consiste em um mecanismo de defesa do organismo para remoção do estímulo lesivo, proteção do dano causado por este estímulo e culmina em processos de reparação tecidual, como cicatrização, regeneração e restauração da função fisiológica (NASEF et al., 2017; RANKIN, 2004; TAKEUCHI, 2016; TIZARD, 2002).

Inicialmente, a resposta inflamatória ocorre por meio de 3 eventos principais: aumento do suprimento sanguíneo na área afetada, aumento da permeabilidade capilar e migração de leucócitos (RANKIN, 2004). Este processo pode ser desencadeado por agentes externos, como micro-organismos e irritantes químicos, ou pode ser ativado por fatores endógenos sintetizados por células, como substâncias resultantes do metabolismo celular ou necrose (CARLBERG et al., 2016, NASEF et al., 2017). Apesar de extremamente necessário, este processo pode em determinadas situações ser exacerbado, levando a efeitos deletérios (WARD, 2010).

A inflamação pode ser classificada em aguda e crônica, em que a primeira possui duração curta, ocorrendo em um período de minutos, horas ou dias. Já a segunda possui período longo, de meses ou anos (BAUMANN; GAULDIE, 1994; SERHAN, 2007). A fase aguda do processo inflamatório é caracterizada por sinais cardinais descritos por Cornelius Celsius desde 30 a.C., que incluem rubor (vermelhidão devido à hiperemia), tumor (inchaço decorrente do aumento da permeabilidade vascular e do extravasamento de plasma), calor (associado ao aumento do fluxo sanguíneo e atividade metabólica das células inflamadas) e dor (devido a mudanças na perivasculatura e associado à sensibilização das terminações nervosas), além da perda de função, um quinto sinal que foi acrescentado por Virchow (1821-1902) (LIBBY, 2007; ROCHA; SILVA, 1978). Esses sinais são causados como consequência das alterações vasculares e celulares na

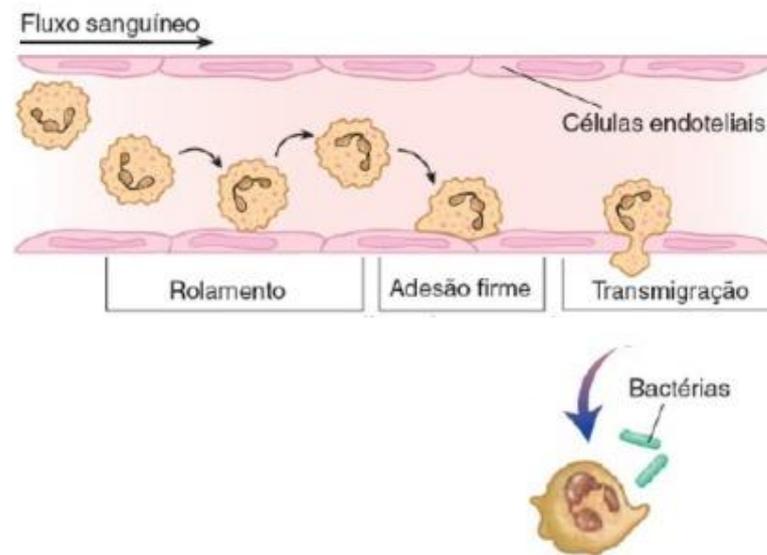
microcirculação da área lesada, causada pela liberação de vários mediadores químicos (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; LIBBY, 2007).

Por sua vez, o processo de inflamação crônica está associado, em seus aspectos histológicos, à presença, no local lesado, de linfócitos e macrófagos, além da proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose (GILROY et al., 2004; WARD, 2010), destacando-se também a capacidade de leucócitos de liberar substâncias quimiotáticas, as quais vão contribuir para a migração de novas células para o local do dano (RIBEIRO et al., 2000).

O início do processo inflamatório é mediado por células imunes ativadas pelos receptores de reconhecimento de patógenos (PRRs), como os receptores *Toll-like*. Esta ativação leva à síntese de mediadores pró-inflamatórios, como citocinas e derivados do ácido araquidônico, levando a ativação das vias de sinalização inflamatória (ALA et al., 2003; FEEHAM; GILROY, 2019). Paralelamente, a ativação das moléculas de adesão na circulação promove o recrutamento de leucócitos e células fagocíticas, como neutrófilos e monócitos. Há também ativação de proteínas plasmáticas que contribuem para a remoção dos debris celulares, micro-organismos ou corpos estranhos da área inflamada (MURPHY; WEAVER, 2016). Esta limpeza ocorre por diferentes mecanismos intracelulares como pela produção das ERO e mecanismos de liberação de redes de neutrófilos extracelular (BROOM; KOGUT, 2018; FEEHAM; GILROY, 2019).

A resposta celular, promovida pelos leucócitos, começa pelo processo de marginalização, onde os leucócitos migram para a periferia dos vasos sanguíneos e interagem com as células endoteliais. As interações entre estes 2 tipos celulares são moduladas por moléculas de adesão, como ICAM-1 e selectinas. Os leucócitos migram ativamente pelos espaços intercelulares alcançando os espaços teciduais, seguindo a sequência de marginação, rolamento, adesão firme e transmigração. Além das moléculas de adesão, há participação de quimiocinas nestes processos. Tais quimiocinas são liberadas pelas células endoteliais e facilitam a quimiotaxia de leucócitos para a área inflamada (GERMOLEC et al., 2018; RAKIN, 2004; Figura 1).

**Figura 1** - Migração celular durante o processo inflamatório agudo.



Fonte: adaptado de Porth e Matfin (2016).

No processo inflamatório também destacamos a ativação da via do fator nuclear  $\kappa$ B, que está relacionada a regulação e liberação de mediadores pró-inflamatórios, incluindo citocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento. Além disso, também modulam a atividade da enzima ciclo-oxigenase-2 (COX-2) e a óxido nítrico sintase induzida (CHEN; NUNES et al., 2010; HANADA; YOSHIMURA, 2002).

É importante destacar a importância dos mediadores lipídicos na inflamação. Eles participam ativamente neste processo, tanto na fase inicial quanto na fase resolutive. Os eicosanoides, representantes desta classe, coordenam ações iniciais da inflamação aguda (SERHAN, 2007). Estes compostos são resultantes da metabolização de ácidos graxos poli-insaturados derivados dos fosfolipídeos de membrana, como o ácido araquidônico. Este ácido graxo contém 20 carbonos e 4 duplas ligações carbono-carbono e pode ser mobilizado a partir da biomembrana pela ação de enzimas denominadas fosfolipases, cuja maior representante é a fosfolipase A<sub>2</sub> (CALDER, 2006; LEI et al., 2014).

Prostaglandinas, prostaciclina, tromboxano e leucotrienos são os principais componentes do grupo dos eicosanoides e são descritos por estimular ações importantes decorrentes do processo inflamatório, como alteração do fluxo sanguíneo e recrutamento de células do sistema imune. A formação destes componentes derivados de ácido graxo é catalisada por 2 famílias de enzimas, as

enzimas lipoxigenase e as enzimas ciclo-oxigenases (COXs) (CALDER, 2006; LEI et al., 2014).

A via de sinalização da COX é mediada pela ação de duas isoformas enzimáticas, denominadas de COX-1, conhecida por ser constitutiva e COX-2, induzida em processos patológicos, a exemplo da resposta inflamatória. Elas participam da produção de prostaglandinas e tromboxanos. Estes produtos, também conhecidos como prostanoides, medeiam alterações vasculares e a migração leucocitária no processo inflamatório (MARION-LETELLIER; SAVOY; GHOSH, 2015). Já a via das lipoxigenases participa da formação de leucotrienos, importantes mediadores que atuam na permeabilidade vascular, quimiotaxia e secreção de citocinas (CALDER, 2006).

As etapas envolvidas no processo inflamatório têm por objetivo principal remover o agente causador e/ou reparar o tecido lesionado (KUMAR et al., 2004; WARD, 2010). Se o processo inflamatório agudo falhar na eliminação do agente causador, essa resposta persiste e adquire novas características. Por exemplo, a infiltração neutrofílica é substituída por monócitos ou células T. A efetividade da resposta inflamatória é importante, pois uma resposta insuficiente resulta em uma defesa inadequada, o que pode levar a patologias como o câncer, assim como, a presença de patógenos persistentes pode desencadear uma resposta exacerbada, o qual pode desregular o sistema autoimune. Estes eventos podem culminar no desenvolvimento de patologias como artrite reumatoide, doença de Alzheimer, aterosclerose, diabetes, psoríase dentre outras doenças (MEDZITOV, 2008; NASEF et al., 2017; TRACEY, 2002; AYALA-FONTÁNEZ; SOLER; MCCORMICK, 2016).

## **2.2 Estresse Oxidativo**

Segundo o conceito clássico de Sies (1991), “estresse oxidativo consiste em um distúrbio entre o equilíbrio pró-oxidante e antioxidante, em favor das espécies oxidantes levando a um dano potencial”. Sendo assim, o estresse oxidativo ocorre pela formação de espécies reativas de oxigênio, espécies reativas de nitrogênio e espécies reativas sulfúricas nas células e tecidos e/ou pela deficiência do sistema antioxidante em protegê-los dos ataques destas espécies reativas. Estes ataques

podem danificar a estrutura celular, provocando alterações em proteínas, lipídeos, DNA e RNA (CAROCHO et al., 2013; PRYOR et al., 2006).

As espécies reativas podem ser radicais livres ou oxidantes não-radicalares. Radicais livres são átomos, moléculas ou íons com um elétron não pareado na órbita externa. Estes radicais são altamente instáveis e tendem a reagir quimicamente com outras substâncias gerando oxidação (CHEESEMAN; SLATER, 1993; MITTAL et al., 2014). Eles são derivados, geralmente, de moléculas de oxigênio, nitrogênio e sulfeto (CAROCHO et al., 2013; LU et al., 2010). Já os oxidantes não-radicalares são representados pelo peróxido de hidrogênio e pelo ácido hipocloroso, possuindo ação importante no estresse oxidativo (CAROCHO et al., 2013; MASELLA et al., 2005). Esses compostos são resultantes de fontes endógenas e reações oxidantes decorrentes das vias metabólicas celulares, bem como de processos patológicos como a inflamação, isquemia e reperfusão. Fontes exógenas como poluentes, cigarro e radiação ultravioleta (UV) também estão relacionadas com a estimulação direta ou indireta da produção dessas espécies (CAROCHO et al., 2013).

As ERO são representadas pelos radicais superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), os radicais hidroxil (OH), entre outros. Já os principais representantes das espécies reativas de nitrogênio são o óxido nítrico (NO) e peróxido nitrito ( $OONO^{\cdot-}$ ). As espécies reativas sulfúricas, por sua vez, incluem os radicais tióis e são formados por reações das ERO com os radicais tióis (ALI et al., 2020; LI et al., 2010). Os radicais superóxido são importantes representantes de ERO e do processo do estresse oxidativo. Eles estão presentes em todas as células aeróbias e são produzidos por processo enzimático, auto-oxidação e por reações não-enzimáticas (CHEESEMAN; SLATER, 1993).

Destaca-se a reação não-enzimática que ocorre nas mitocôndrias pelo processo de respiração celular, no qual há transferência de um elétron para a molécula de  $O_2$ . Os processos enzimáticos envolvem a participação de diferentes enzimas, como a xantina oxidase, lipoxigenase, COX e fosfato dinucleotídeo adenina nicotinamina (NADPH) dependente de oxidase (LU et al., 2010; PRYOR et al., 2006). Nestas, o superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) pela enzima superóxido dismutase (SOD) via reação de Haber-Weiss, podendo ser convertido a outras ERO como os radicais hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ). Estes são então estabilizados e transformados em água pela enzima catalase. Além disso, o

peróxido de hidrogênio pode interagir com  $\text{Fe}^{+2}$  formando o radical hidroxila ( $\text{HO}\cdot$ ), esta reação é chamada de reação de Fenton. Nesta, os lipídeos gerados levam ao processo de peroxidação lipídica. A conversão do peróxido de hidrogênio também pode ocorrer pela reação com outros íons como o  $\text{Cu}^+$  e  $\text{Cl}^-$  (LU et al., 2010; MITTAL et al., 2014).

Representante das espécies reativas de nitrogênio, o peróxido de nitrito é formado pela reação entre o superóxido e o óxido nítrico e constitui-se um composto altamente reativo que modifica as ligações de anéis de zinco, tióis e ferro-sulfúrico e pode oxidar lipídeos, proteínas e DNA, danificando assim estas estruturas celulares (LUGRIN et al., 2014).

A reatividade desses compostos, conforme já mencionado, é potencialmente lesiva às estruturas e biomoléculas celulares (LIU et al., 2018). A exemplo, podem interagir com moléculas de DNA provocando modificações nas bases nitrogenadas, mudanças nas ligações proteicas e alterações cromossômicas, levando a mutações nas fitas de DNA. Estas mutações estão relacionadas ao processo de carcinogênese, por exemplo (PHANIENDRA et al., 2015). Nesse contexto, destacam-se os radicais hidroxila ( $\text{OH}\cdot$ ), produzidos na reação de Fenton, como espécie química importante na formação de danos oxidativos no DNA (PHANIENDRA et al., 2015). O RNA é mais vulnerável as ações de oxidação e mudanças nas estruturas proteicas desencadeadas pelo estresse oxidativo, sendo assim, as espécies reativas também são capazes de ocasionar mutagênese nas fitas de RNA.

Os danos também podem ocorrer nas proteínas, ocorrendo por exemplo desnaturação proteica e perda da função, com consequências como perda da atividade enzimática, perda da função de receptores e alterações em proteínas carreadoras ou sinalizadoras. Outra importante alteração ocasionada pelas espécies reativas é a peroxidação lipídica, processo que resulta na perda da funcionalidade da membrana e ocorre pela oxidação dos ácidos graxos das cadeias laterais de lipídeos da membrana que são convertidos a hidroperóxidos. Estes podem interagir com outros radicais e íons metálicos gerando compostos citotóxicos com o malonaldeído e 4-hidroxi-2-nonenal. Estes compostos formados também causam

alterações no DNA e proteínas (CHEESEMAN; SLATER, 1993; LU et al., 2010; MASELLA et al., 2006; PHANIENDRA et al., 2015).

Para neutralizar a ação do sistema oxidante, o organismo criou um mecanismo de defesa, o qual é conhecido como sistema antioxidante e está presente nas células e é representado por enzimas e substâncias antioxidantes (MITTAL et al., 2014). A primeira linha de defesa consiste na remoção das espécies reativas e radicais livres pelas enzimas antioxidantes, como a SOD, CAT e glutathione peroxidase (LU et al., 2010; VEAL et al., 2013).

A SOD está localizada no citosol e mitocôndria, sendo uma metaloenzima. Ela catalisa a reação do superóxido a peróxido de hidrogênio. Já a CAT, localiza-se também na mitocôndria e é considerada a principal enzima antioxidante, pois catalisa a transformação do peróxido de hidrogênio em água e O<sub>2</sub>, neutralizando assim a reação oxidante (CHEESEMAN; SLATER, 1993; MITTAL et al., 2014). A glutathione é um antioxidante endógeno que regula a homeostase redox, participando da decomposição de hidroperóxidos (SAMIEC et al., 1998). As glutathione peroxidase e redutase requerem a participação da glutathione como cofator nas suas reações (MASELLA et al., 2006). A glutathione peroxidase catalisa a reação de redução de hidroperóxidos orgânicos e inorgânicos à água e seus correspondentes alcoólicos. A glutathione redutase, por sua vez, reduz a glutathione oxidada a glutathione utilizando NADPH (CHEESEMAN; SLATER, 1993; MASELLA et al., 2006).

As defesas antioxidantes não-enzimáticas são, geralmente, obtidas de micronutrientes adquiridos na dieta. Estes incluem vitamina A, vitamina C e vitamina E. Além disso, são provenientes de outras classes de nutrientes, como os flavonoides, carotenoides, ácidos fenólicos e sais minerais. Estes antioxidantes atuam de diversas formas prevenindo os danos nas estruturas celulares ocasionados pelos agentes oxidantes (ALI et al., 2020, CAROCHO; FERREIRA, 2013; TOKARZ et al., 2013).

Sabe-se que as alterações celulares e moleculares desencadeadas pelo estresse oxidativo podem desencadear diversas patologias, como câncer, doenças neurodegenerativas, artrite reumatoide, diabetes, obesidade, entre outras (YAN et al., 2010). Adicionalmente, o estresse oxidativo também é descrito por influenciar o sistema imunológico, já que as espécies reativas participam da modulação de fator

nuclear  $\kappa B$ , que consiste em importante via ativada no processo inflamatório, responsável pela estimulação e liberação de diferentes citocinas inflamatórias (LUGRIN et al., 2014).

### 2.3 *Annona muricata* L.

A *Annona muricata* L. consiste em uma espécie de planta popularmente conhecida pelo sabor e aroma de seus frutos. Identificada no Brasil como graviola, é uma espécie encontrada em regiões tropicais e subtropicais, incluindo América Central e do Sul, África e Ásia, particularmente em áreas com altitude acima de 1200 m acima do nível do mar e temperatura entre 25 e 28°C (CORIA-TÉLLEZ et al., 2017, 2018; WAHAB et al., 2018).

**Figura 2** - *Annona muricata* L. A: planta inteira, B: folhas, C: flor, D: fruto e E: sementes.



Fonte: adaptado de Wahab et al. (2018).

Esta espécie é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de diversas patologias. Diferentes partes desta planta, como folhas, frutos, sementes e caule são utilizadas terapêuticamente como analgésico, anti-helmíntico, antimicrobiano, anti-inflamatório, além de apresentarem efeitos benéficos contra hipertensão, gripe, asma, doenças dermatológicas, câncer, dentre outras condições (ABDILLAH et al., 2015; DE LIMA; ALVES, 2011; WAHAB et al., 2018). Especialmente, preparações das folhas da *A. muricata* têm sido utilizadas em doenças inflamatórias e dolorosas (MISHRA et al., 2013; WAHAB et al., 2018).

Fitoquimicamente, foram identificados mais de 200 compostos ativos em diferentes preparações da *A. muricata*. Os compostos mais predominantes pertencem aos grupos das acetogeninas, alcaloides e compostos fenólicos (CORIA-TELLEZ et al., 2017). A maioria destes compostos foi encontrada em extratos, como o extrato aquoso (CORIA-TELLEZ et al., 2018).

Estudos pré-clínicos têm sido conduzidos a fim de comprovar os efeitos benéficos conhecidos popularmente, bem como, desvendar os mecanismos de ação envolvidos nestes efeitos. Vários estudos reportaram efeito antineoplásico da *A. muricata*. Este efeito abrange redução da proliferação de células de linhagem de câncer, como células do colón, pulmão e mielogênica (leucemia). Os mecanismos relacionados a esta ação antiproliferativa envolvem regulação de vias da caspase 3 e 9, da atividade mitocondrial, da quinase regulada por sinal extracelular e fosfoinosítídeo 3-quinase, via fator nuclear  $\kappa$ B, e modulação da atividade oxidante, dentre outros mecanismos (GAVAMUKULYA et al., 2017, RADY et al., 2018, TORRES et al., 2012).

Vale destacar que propriedades antioxidantes da *A. muricata* também são descritas na literatura. Extratos metanólico e aquoso das folhas desta planta apresentaram efeito antioxidante em ensaios para eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) e do radical hidroxil (GEORGE et al., 2015). Além disso, o extrato etanólico da casca do caule desta mesma planta apresentou proteção contra a peroxidação lipídica (PADMA et al., 2001), bem como potencial para eliminação do radical DPPH e aumento significativo das atividades de enzimas antioxidantes em ratos (OLAKUNLE; ONYECHI; JAMES, 2014).

Estudo realizado com ratos diabéticos induzidos por streptozotocina demonstrou modulação do estresse oxidativo do extrato aquoso das folhas da *A. muricata*, com redução da produção de espécies reativas de oxigênio e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), além da restauração das atividades alteradas das enzimas antioxidantes glutathiona peroxidase e superóxido dismutase (ADEWOLE; OJEWOLE, 2008). Efeito semelhante, com redução dos níveis de TBARS e óxido nítrico e restauração da atividade de SOD total e conteúdo de glutathiona testicular de ratos diabéticos induzidos por STZ, também foram reportados (ALSENOSY et al., 2019).

Outras investigações sugerem efeito anti-inflamatório da *A. muricata*. Chan e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com extrato etanólico de *A. muricata* reduziu edema e concentrações de citocinas pró-inflamatórias em modelo de artrite induzida por adjuvante completo de Freund (CFA) em ratos; apresentando, portanto, efeito anti-inflamatório. Este extrato também promoveu redução de edema em modelo de inflamação de pata induzida por carragenina em ratos (ROSLIDA et al., 2010). Em modelo semelhante induzido em camundongos, Poma e colaboradores (2011) mostraram que o efeito anti-inflamatório do tratamento com extrato aquoso de *A. muricata* foi comparável ao da indometacina, um conhecido anti-inflamatório não esteroideal usado como controle positivo inibindo a atividade da COX. Outros estudos trazem a associação entre o potencial anti-inflamatório do extrato com a redução de citocinas pró-inflamatórias e modulação da liberação de óxido nítrico (KIM et al., 2016; LAKSMITAWATI et al., 2016).

Adicionalmente, Quilez e colaboradores (2015) demonstraram efeito anti-inflamatório do extrato aquoso dessa espécie em modelos animais de edema de pata induzido por carragenina e de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos. Para o modelo de edema de orelha, foi evidenciado o potencial anti-inflamatório tópico com redução do edema e inibição da atividade da mieloperoxidase do extrato aquoso das folhas *A. muricata*. O extrato etanólico das folhas desta planta também reduziu a nocicepção induzida pela injeção de formalina na pata de camundongos tanto na primeira quanto na segunda fases do teste. Além disto, este extrato também diminuiu a nocicepção em modelo de contorções abdominais induzido por ácido acético. Em conjunto, estes

achados revelam efeito antineurogênico e anti-inflamatório associados ao efeito antinociceptivo (HAMID et al., 2012).

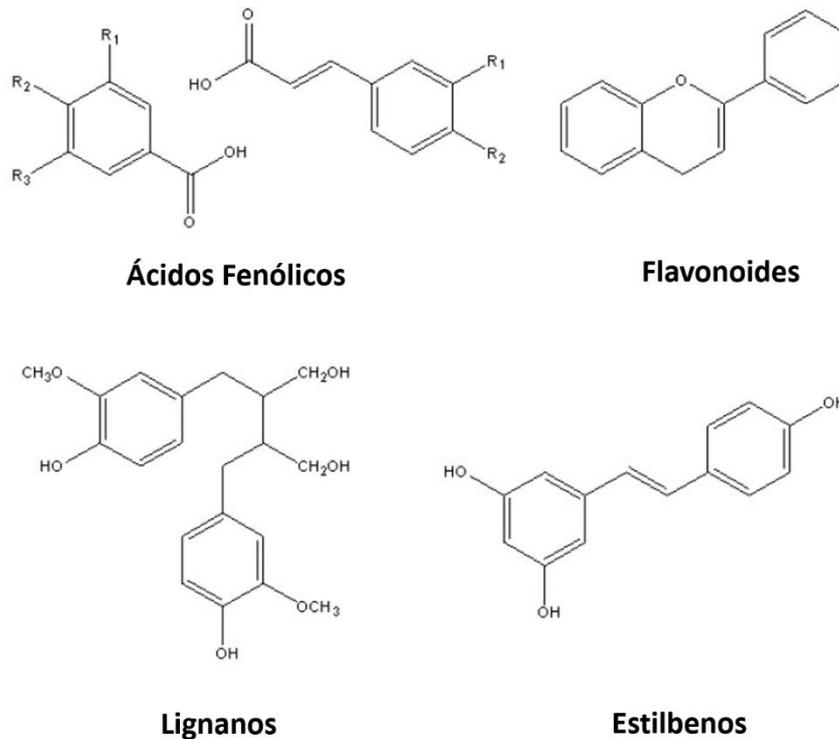
Por fim, efeito antinociceptivo também foi mostrado em extrato dos frutos de *A. muricata* nos testes de formalina, placa quente e contorções abdominais. Este efeito antinociceptivo foi relacionado à participação do sistema opioide e dos canais para  $K^+$  dependentes de ATP (ISHOLA et al., 2012). Este mesmo extrato também reduziu o edema de orelha induzido por xileno em camundongos. Tal efeito anti-inflamatório foi associado à inibição das atividades da COX-1 e COX-2, além da modulação da liberação de óxido nítrico (ISHOLA et al., 2012).

### **2.3 Compostos Fenólicos e Flavonoides**

Dentre os antioxidantes encontrados nas fontes vegetais da dieta humana, os polifenóis são os mais abundantes (~1 g/d) sendo encontrados em frutas, café, chá e cereais, bem como em muitas plantas medicinais (LIU et al., 2018; MANACH et al., 2004). O consumo de alimentos e bebidas ricos nesses compostos tem sido associado a redução do risco de doenças como câncer, doenças cardiovasculares, inflamação e outras (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000). Em consonância, os efeitos protetores destes fitoquímicos têm sido relacionados a sua atividade antioxidante extensivamente descrita na literatura, também sendo reportados por suas atividades anti-inflamatória, cardioprotetora, vasoprotetora dentre outras (ANSARI; AHMAD; HAQQI, 2020; LECOUR; LAMONT, 2011; QUIÑONES; MIGUEL; ALEIXANDRE, 2013; SEARS; RICORDI, 2012). Suas estruturas químicas lhe conferem uma ação redutora, a qual juntamente com outros antioxidantes não enzimáticos advindos da dieta protegem os tecidos do corpo contra o estresse oxidativo (SCALBERT; WILLIAMSON, 2000).

Os polifenóis são metabólitos secundários das plantas, estando envolvidos em processos fisiológicos de defesa como proteção contra radiação ultravioleta ou contra patógenos. São classificados em diferentes grupos funcionais de acordo com o número de anéis fenólicos e dos elementos estruturais ligados a estes. Assim temos os ácidos fenólicos, flavonoides, estilbenos e lignanos como principais grupos componentes dos polifenóis (Figura 3) (MANACH et al., 2004).

**Figura 3 -** Estrutura química dos polifenóis.

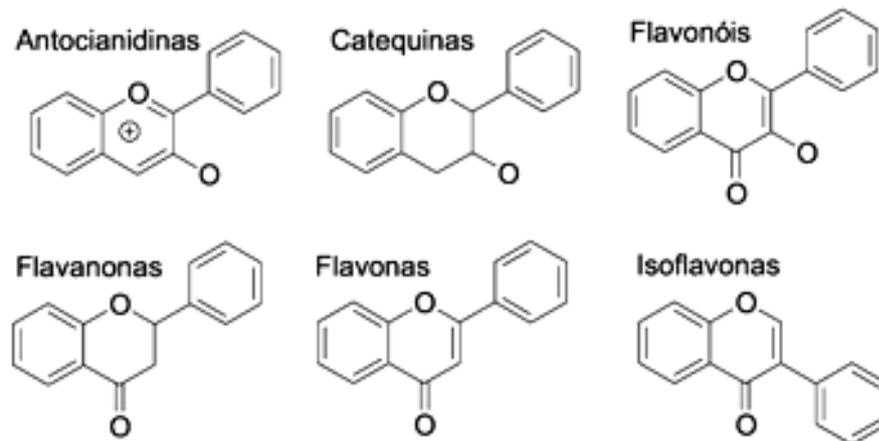


Fonte: adaptado de Li et al. (2014).

Os flavonoides são os polifenóis mais abundantes em nossa dieta e podem ser encontrados na forma de glicosídeos e agliconas em frutas, vegetais, sementes, caules, castanhas, além de estarem presentes no vinho tinto e chás. Esta importante classe participa do processo de fotossíntese das plantas e é responsável pela coloração, sabor, proteção de vitaminas e enzimas nas plantas (PANCHE et al., 2016). Quimicamente, possuem 3 anéis em comum na sua estrutura química, sendo 2 anéis benzenos ligados a 3 carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) (CAZAROLLI et al., 2008).

Há mais de 6000 tipos de flavonoides identificados (FERRER et al., 2008; ZAKARYAN et al., 2017). Devido à grande variedade de compostos, os flavonoides são subclassificados de acordo com sua estrutura química em 6 grupos principais: flavonas, flavononas, isoflavonas, flavonóis, catequinas e antocianidinas (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008). Sabe-se que as diferenças entre as subclasses dependem dos níveis de oxidação e dos padrões de substituição do anel C (Figura 4). Já as diferenças entre os compostos dentro de uma mesma classe dependem dos padrões de substituição dos anéis A e B (KUMAR; PANDEY, 2013; MIDDLETON, 1998).

**Figura 4** - Principais subclasses dos flavonoides.



Fonte: Março, Poppi e Scarminio (2008).

Os flavonoides são amplamente conhecidos por suas propriedades benéficas. Dentre elas, a atividade antioxidante se destaca por estar presente em todas as subclasses de flavonoides (KUMAR; PANDEY, 2013, PANCHE et al., 2016). Vale ressaltar que a atividade antioxidante destes compostos pode ocorrer por diferentes vias. Por exemplo, estes compostos podem neutralizar os radicais livres, tornando estas moléculas mais estáveis. Também possuem habilidade em quelar os íons metálicos, que participam de importantes reações do estresse oxidativo (TUNGMUNNITHUM et al., 2018; MALEKI et al, 2019). Além de neutralizar os radicais livres, os flavonoides também impedem a sua formação, atuando nas cascatas bioquímicas do estresse oxidativo. Adicionalmente, os flavonoides impedem a formação da peroxidação lipídica, contribuindo para a redução do desbalanço do sistema oxidante (Li et al., 2016, MALEKI et al., 2019; KUMAR; PANDEY, 2013).

Estes compostos polifenólicos também são conhecidos por sua atividade anti-inflamatória. Os flavonoides são capazes de modular o processo inflamatório por diferentes mecanismos. Um deles consiste na inibição da expressão de enzimas importantes como a óxido nítrico sintase induzida, COX e lipoxigenase. Tais enzimas participam da produção de mediadores pró-inflamatórios, como os prostanoídes, quimiocinas, citocinas e moléculas de adesão. Além disso, os flavonoides também podem modular fatores de transcrição que regulam a atividade inflamatória, como o fator nuclear  $\kappa$ B, cujo mecanismo pode ser atribuído à inibição da atividade

transcricional, com conseqüente redução na transcrição dos genes envolvidos na expressão de citocinas pró-inflamatórias (PENG et al., 2018). Outra ação importante consiste na neutralização dos radicais livres liberados pela atividade de células como os neutrófilos (MALEKI et al., 2019, RATHEE et al., 2009, TUNGMUNNITHUM et al., 2018). Finalmente, estes compostos fenólicos também são capazes de modular as células imune, tanto inibindo a ativação destas células, quanto modulando a maturação, sinalização e secreção (MALEKI et al., 2019).

Outras propriedades importantes são destacadas para os flavonoides, como antimicrobiana, antiviral, anticâncer, hepatoprotetor, efeito cardioprotetor, proteção UV dentre outros (CAZAROLLI et al., 2008; PANCHE et al., 2016; TUNGMUNNITHUM et al., 2018). Diversos compostos já têm sido caracterizados, tanto em modelos *in vivo* quanto em modelos *in vitro*. A quercetina, por exemplo, que é um flavonoide pertencente à subclasse dos flavonois, possui cor amarela como característica e está presente em diversos alimentos, como brócolis e cebola. A quercetina possui atividade anti-inflamatória e antioxidante comprovada, agindo na inibição das enzimas COX e óxido nítrico sintase induzida (DAVID et al., 2016, GARCIA-MEDIAVILLA, 2007). Javadi e colaboradores (2017) mostraram, em estudo clínico controlado e randomizado, que a ingestão de quercetina (500 mg/dia) durante 8 semanas reduziu as concentrações de Fatores de Necrose Tumoral Alfa (TNF- $\alpha$ ) e melhorou a qualidade de vida dos pacientes portadores de artrite reumatoide comparado ao grupo placebo (JAVADI et al., 2017).

Outro flavonoide muito conhecido é a rutina. Este composto também é um flavonol e está presente no trigo, chás e maçã. Possui atividades farmacológicas descritas como anti-inflamatória, antioxidante, anticarcinogênica e neuroprotetora (ENOGIERU et al., 2018, GANESHPURKA; SALUJA, 2017). Outros compostos muito conhecidos como, catequinas, ácido clorogênico e ácido gálico, também possuem propriedades farmacológicas importantes, incluindo a ação antioxidante e anti-inflamatória e tem trazido resultados promissores no tratamento de diferentes doenças. Sendo assim, vale ressaltar que a implementação destes compostos na dieta pode trazer benefícios referentes a prevenção de diversas patologias (MIAO; XIANG, 2020; MUSIAL et al., 2020; PAN et al., 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Geral

Investigar o efeito da aplicação tópica do extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L. (EAAM) em um modelo agudo de inflamação cutânea e avaliar o papel da sua atividade antioxidante.

#### 3.2 Específicos

- Realizar a quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides totais do EAAM, assim como a caracterização de compostos fenólicos.
- Investigar a atividade antioxidante do EAAM em ensaios *in vitro*.
- Avaliar o efeito do EAAM sobre a viabilidade celular e liberação de ERO em fibroblastos L929.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do EAAM no modelo animal de inflamação de orelha.
- Avaliar a atividade antioxidante do EAAM no modelo animal de inflamação de orelha.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Coleta e identificação da planta

As folhas da *Annona muricata* L. (Annonaceae) foram coletadas em Janeiro de 2016 na Universidade Federal de Sergipe (UFS), Campi Professor José Aloisio, localizada em São Cristóvão, Sergipe, Brasil (11°01'47"S, 37°20'64"W). A respectiva planta foi identificada pela botânica Prof. Dra. Ana Paula Silver e um exemplar coletado encontra-se depositado com número de registro ASE 35586 no Herbário da Universidade Federal de Sergipe, CCBS, Departamento de Biologia, São Cristóvão, Sergipe, Brasil.

### 4.2 Preparo do extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM)

Esta etapa foi realizada no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, com a colaboração do Prof. Dr. Marcelo Cavalcante Duarte.

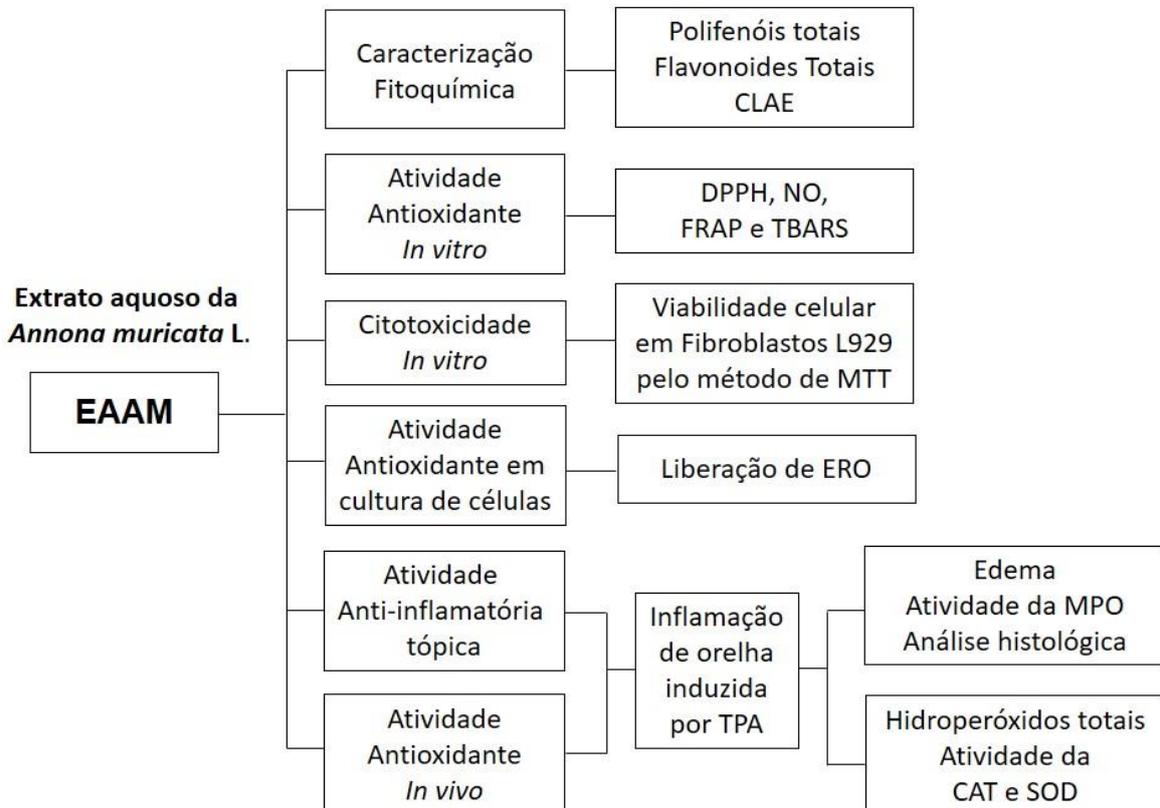
As folhas da *A. muricata* foram secas em estufa (MA035/5, Marconi®, Piracicaba, SP), com renovação de ar circulante, sob temperatura média de 40°C por 72 horas. Depois de secas, o material foi submetido ao processo de pulverização em moinho de facas, tipo Wiley, produzindo 300 g de pó seco. A infusão do pó das folhas foi preparada utilizando proporção de 100 g de pó para 1 L de água destilada (100°C). Após resfriamento em temperatura ambiente (25°C), o infuso foi filtrado sob pressão reduzida, recuperando 1,8 L de solução que, posteriormente, foi submetida a secagem por liofilização (LS3000, Terroni, São Carlos, Brasil) para obtenção do extrato seco (28,2 g) com rendimento de 9,4% (m/m).

### 4.3 Delineamento experimental

Após obtenção do EAAM, foram delineados os experimentos a fim de quantificar e caracterizar os compostos fenólicos, avaliar a atividade antioxidante por

ensaios *in vitro*, além das atividades anti-inflamatória e antioxidante por métodos *in vivo*. O delineamento experimental segue detalhado na figura 5.

**Figura 5** - Delineamento experimental.



Legenda: CAT: catalase; CLAE: cromatografia líquida de alta eficiência; DPPH: 2,2-difenil-1-picril-hidrazila; FRAP: potencial redutor de ferro; MPO: mieloperoxidase; MTT: metil-tiazolil-tetrazólio; NO: óxido nítrico; ERO: espécie reativa em oxigênio; SOD: superóxido dismutase; TBARS: substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico; TPA: 12-O-tetradecanoilforbol acetato.

#### 4.4 Quantificação de compostos fenólicos totais no EAAM

O conteúdo fenólico total no EAAM foi analisado pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLIS, 1959) com algumas modificações. Alíquotas do EAAM (12,5 µL) foram misturadas com 200 µL de água destilada e, posteriormente, o reagente de Folin-Ciocalteu (12,5 µL) foi adicionado à mistura. Após 3 minutos, 25 µL de solução saturada de carbonato de sódio foram adicionados e a reação foi mantida em repouso por 1 hora. A leitura da absorbância foi feita em espectrofotômetro a 720 nm. Foi utilizada uma curva padrão de ácido gálico (10 a

200 µg/mL) e os resultados foram expressos como mg equivalente de ácido gálico/g de extrato seco.

#### **4.5 Quantificação de flavonoides totais do EAAM**

Os flavonoides totais presentes no EAAM foram determinados conforme previamente descrito (ZHISHEN; MENGCHENG; JIANMING, 1999), com pequenas modificações. Em uma microplaca, 25 µL da solução teste foi misturada com água destilada (110 µL) e, subsequentemente, com solução de NaNO<sub>2</sub> (5%, 7,5 µL). Após 6 minutos, a solução de AlCl<sub>3</sub> (10%, 7,5 µL) foi adicionada, mantendo-se por cerca de 6 minutos e, em seguida, a solução de NaOH (4%, 100 µL) foi adicionada. A solução foi mantida por 15 minutos. A absorbância foi mensurada a 510 nm. Foi utilizada curva padrão de catequina (7,25 a 145 µg/mL) e os resultados, expressos como mg equivalente de catequina/g de extrato seco.

#### **4.6 Caracterização de compostos fenólicos por CLAE**

A etapa da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada no Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Sergipe, com a colaboração do Prof. Dr. Adriano Antunes de Souza Araújo, conforme metodologia descrita por Oliveira e colaboradores (2017).

O EAAM foi diluído em metanol (grau de CLAE) até a concentração de 2 mg/mL. Esta solução foi submetida ao sonificador ultrassônico por 15 minutos e filtrada em membrana de 0,45 µm (PTFE) antes da injeção por CLAE. A análise foi realizada utilizando o sistema de cromatografia líquida de alta performance composto por desgaseificador DGU-20A3, duas bombas LC-20AD, um auto-injetor SIL-20A HT, coluna forno CTO-20A, detector de matriz de fotiodo (DAD) SPDM20Avp (DAD) e um sistema controlador CBM-20A (Shimadzu Co., Kyoto, Japão).

A separação cromatográfica foi feita usando Shim-packC18 com coluna analítica 250 x 4,6 mm (5 µm tamanho de partícula). A fase móvel consistiu como gradiente de: A: 0,5% ácido acético em água (Sistema de Milli-Q) e B: metanol (grau

CLAE), começando com 5% B durando 5 minutos, 5 – 25% B entre 5 – 10 minutos, 25 – 30% B entre 10 – 15 minutos, 30 – 45% B entre 15 – 35 minutos, 45 – 50% B entre 35 – 40 minutos, 50 – 55% B entre 40 – 45 minutos, 55 – 100% B entre 45 – 60 minutos, finalizando a análise. A injeção de volume foi 20 µL e o fluxo da fase móvel foi de 1,0 mL/min.

A detecção foi configurada a 320 nm por análises de pico. Os compostos foram identificados por injeções padrões comparando o tempo de retenção de ácido gálico (C<sub>7</sub>H<sub>6</sub>O<sub>5</sub>; Sigma-Aldrich), ácido clorogênico (C<sub>16</sub>H<sub>18</sub>O<sub>9</sub>; Sigma-Aldrich), catequina (C<sub>15</sub>H<sub>14</sub>O<sub>6</sub>; Sigma-Aldrich), quercetina 3-glucosídeo (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>12</sub>; Sigma-Aldrich) e rutina (C<sub>27</sub>H<sub>30</sub>O<sub>16</sub>; Sigma-Aldrich), os quais foram diluídos em metanol (grau CLAE) até 100 µg.mL<sup>-1</sup>. As análises quantitativas foram realizadas utilizando curvas de calibração de cada padrão identificado. Preparadas em cinco concentrações diferentes: 1, 5, 10, 25 e 50 µg/mL. Os dados foram adquiridos por meio do software *LC Solution*.

#### **4.7 Avaliação da capacidade antioxidante do EAAM *in vitro***

Esta etapa foi realizada no Departamento de Nutrição da Universidade Federal de Sergipe, com a colaboração da Profa. Dra. Ana Mara de Oliveira e Silva.

##### **4.7.1 Atividade antioxidante do EAAM por eliminação de radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)**

Para a avaliação da capacidade antioxidante contra o radical DPPH foi utilizada a metodologia descrita por Silva e colaboradores (2005) com algumas modificações. Em microplaca, foram adicionados 50 µL de solução de EAAM nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL ou Trolox (100 µg/mL) com 150 µL da solução estoque de DPPH (24 µg/mL), e incubadas à temperatura ambiente por 30 minutos, com posterior leitura de absorbância a 517 nm. O experimento foi realizado em duplicata e os valores de absorbância foram expressos como percentagem de inibição do radical DPPH [Inibição de DPPH (%) = 100 – {(controle – teste)/controle} x 100].

O IC<sub>50</sub> do EAAM foi determinado pela inibição de 50% do radical DPPH. Os valores do percentual de inibição foram comparados como o meio reacional sem adição de extrato ou controle positivo (sistema).

#### 4.7.2 Atividade antioxidante do EAAM por eliminação do óxido nítrico (NO)

A atividade de eliminação do óxido nítrico (NO) foi mensurada segundo Basu e Hazra (2006). Em microplaca, foram adicionados 50 µL do EAAM, nas concentrações de 12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/mL, ou Trolox (100 µg/mL), e 50 µL de nitroprussiato de sódio (20 mmol/L) em tampão fosfato (pH 7,4) e, posteriormente, a solução foi incubada a 37°C por 1 hora. Após este período, foram adicionados 100 µL de reagente de Griess (2% de sulfanilamida, e 0,2% de di-hidroclorato naptiletileno diamina diluído em 5% de ácido fosfórico) e a absorbância mensurada a 540 nm. O experimento foi realizado em duplicata e os valores de absorbância foram expressos como percentagem de inibição do radical NO [Inibição de NO (%) = 100 – {(controle – teste)/controle} x 100]. Além disso, o IC<sub>50</sub> foi calculado e os valores de percentual de inibição comparados com o meio reacional sem adição de extrato ou controle positivo (sistema).

#### 4.7.3 Atividade antioxidante do EAAM pelo potencial redutor de ferro (FRAP)

O potencial redutor do EAAM foi mensurado pelo ensaio de capacidade de redução férrica (FRAP), conforme descrito por Pulido e colaboradores (2000). Em microplaca, 9 µL do EAAM, nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL ou Trolox (100 µg/mL), foram adicionados a 27 µL de água destilada com 270 µL de solução de FRAP recentemente preparada [tampão acetato pH 3,6 (0,3 mmol/L), 2,4,6-tripiridil-s-triazina (10 mmol/L) e cloreto férrico (20 mmol/L)]. A mistura da reação foi incubada a 37°C por 30 minutos e a absorbância mensurada a 595 nm. Uma curva padrão para sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>) foi utilizada para calcular a capacidade redutora do extrato. Os valores foram comparados com o meio reacional sem adição de extrato ou controle positivo (sistema).

#### 4.7.4 Atividade antioxidante do EAAM pela inibição da peroxidação lipídica basal e induzida.

Para este experimento, o cérebro de rato foi removido e o homogenato do tecido preparado em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) na proporção de de 1:9 (m/v). O homogenato foi centrifugado a 8000xg, 4°C, durante 15 minutos e o sobrenadante, utilizado para realização do teste. A peroxidação lipídica foi determinada de acordo com Ohkawa, Ohishi e Yagi (1979) com modificações.

Para determinação da peroxidação lipídica, 100 µL de sobrenadante foram incubados com 50 µL do EAAM, nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL, ou Trolox (100 µg/mL) a 37°C por 40 minutos, na ausência (basal) ou presença (induzida) de sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>, 0,145 mmol/L). Posteriormente, foram adicionados 350 µL de ácido acético (20%) e 600 µL de ácido tiobarbitúrico (0,37%) preparados em 20% de ácido acético. Uma amostra do branco, sem antioxidante (controle) também foi utilizada. As misturas foram incubadas a 85°C por 1 hora e, após resfriadas em gelo, foram centrifugadas a 500xg por 15 minutos.

A absorbância do sobrenadante foi mensurada a 532 nm, os resultados, expressos como percentagem de inibição da peroxidação lipídica [Inibição de lipoperoxidação (%) = [(controle - teste)/controle] x 100] e também foi calculado o IC<sub>50</sub>.

### **4.8 Avaliação da viabilidade celular em fibroblastos L929**

Esta etapa foi realizada no Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, com a colaboração da Profa. Dra. Cristiane Bani Correa.

O ensaio de viabilidade celular foi testado em linhagem celular de fibroblastos L929, utilizando o método colorimétrico que se baseia na redução do metil-tiazolil-tetrazólio (MTT), corante amarelo a um composto azul denominado formazan, que é insolúvel em solução aquosa. As células foram cultivadas em DM meio de Eagle modificado por Dulbecco contendo soro fetal bovino 10% com 50 UI/mL penicilina e estreptomicina 50 µg/mL em uma atmosfera a 5% CO<sub>2</sub> (37°C). Para este ensaio, os fibroblastos foram plaqueados em placas de cultura de 96 poços (2 x 10<sup>4</sup>

células/poço) e, então, tratados com EAAM, nas concentrações de 12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/mL, por 24 horas. A solução de MTT foi adicionada às células e incubadas a 37°C por 3 horas.

Depois de removido o MTT, foi adicionado dimetilsulfóxido (DMSO, 0,1%) para solubilização dos cristais do sal tetrazólio e a leitura de densidade óptica foi mensurada em leitor de placas automático no comprimento de ondas de 570 nm. Os testes foram conduzidos três vezes em triplicatas e, em seguida, normalizados considerando o controle como 100% de viabilidade.

#### **4.9 Avaliação da liberação de ERO em fibroblastos L929**

O teste de liberação de ERO foi realizado utilizando o reagente de diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H<sub>2</sub>DCFDA) de acordo com as instruções do fabricante. Os fibroblastos foram cultivados e plaqueados em placas de 96 poços conforme descrito anteriormente. Após atingirem 70% de confluência, as células foram pré-tratadas com EAAM por 24 horas e, em seguida, expostas ao indutor de estresse (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 750 µmol/L) por 10 minutos e lavadas com PBS. Para detecção de ERO, o reagente H<sub>2</sub>DCFDA foi adicionado em cada poço por 30 minutos. Todos os experimentos incluíram os seguintes grupos: controle (2% soro fetal bovino), H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais veículo e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mais EAAM nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL.

A mensuração de ERO foi realizada por fluorimetria com comprimentos de onda de excitação e emissão definidos em 485 e 525 nm, respectivamente. Os experimentos foram repetidos duas vezes com duas amostras por grupo tratado.

#### **4.10 Avaliação da capacidade anti-inflamatória e antioxidante *in vivo***

##### **4.10.1 Animais de experimentação**

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos (20-30 g) provenientes do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe. Os animais foram mantidos em gaiolas de polipropileno (40 cm x 34 cm x 07 cm)

com grade aramada em aço inoxidável, específica para camundongos, acesso *ad libitum* à água e ração específica para roedores (Marca NUVILAB), em ambiente com temperatura controlada (22-24°C) e ciclos de claro-escuro de 12/12 horas (luz das 6 às 18 horas, controlado por temporizador). A manutenção das gaiolas foi realizada três vezes por semana, nas quais eram efetivadas a higienização, troca das camadas de maravalha e reposição do suprimento de água dos bebedouros e de ração dos comedouros.

Os protocolos experimentais, aos quais os animais em estudo foram submetidos, estão de acordo com os princípios éticos de experimentação animal e foram submetidos ao Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Sergipe, sendo aprovado sob o protocolo com número 9256010719.

#### 4.10.2 Modelo de edema de orelha induzido por 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA)

Para a investigação do potencial anti-inflamatório e antioxidante tópico do EAAM, foi utilizado o modelo de inflamação aguda de orelha induzida pela administração de 12-O-tetradecanoilforbol acetato (TPA). O edema de orelha induzido por TPA foi realizado de acordo com De Young e colaboradores (1989) e adaptada por Oliveira e colaboradores (2017).

Animais (n=6-8) foram anestesiados com isoflurano inalatório para aplicação de 10 µL de TPA (1 µg/orelha dissolvido em acetona) nas superfícies interna e externa da orelha direita com uma ponteira de polipropileno. Após 5 minutos, foram administrados 10 µL do EAAM (0,3; 1 ou 3 mg/orelha, dissolvido em solução salina) ou da dexametasona (0,05 mg/orelha). A orelha esquerda recebeu somente veículo (acetona) e cada animal foi utilizado como seu próprio controle. A eutanásia foi realizada por excesso de isoflurano inalatório 6 horas após a indução da inflamação e então, biópsias de 8 mm de diâmetro da região central da orelha foram obtidas com *punch* de metal.

As orelhas coletadas neste experimento foram utilizadas para: determinação do edema; determinação da mieloperoxidase; análises histológicas; quantificação de hidroperóxidos totais; determinação da atividade das enzimas CAT e SOD.

#### 4.10.3 Determinação do edema das orelhas

Após a eutanásia, as biópsias das orelhas direita e esquerda de cada animal foram coletadas com o auxílio de um *punch* metálico de 8 mm de diâmetro, e suas massas foram mensuradas com o auxílio de uma balança analítica. A medida do edema foi determinada pela variação ( $\Delta$ ) da massa das biópsias, obtida pela diferença entre as respectivas massas da orelha direita pela esquerda, de todos os animais, e expressa em mg.

#### 4.10.4 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO) nas biópsias das orelhas

Para esta análise, foi utilizada a metodologia de Bradley e colaboradores (1982) adaptada por Oliveira e colaboradores (2017). A atividade da MPO foi determinada nos homogenatos das orelhas coletadas e preparadas em tampão fosfato (50 mmol/L, pH 6,0 contendo 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio). Os homogenatos foram centrifugados (2 minutos, 8000xg, 4°C) e alíquotas dos sobrenadantes foram incubadas com uma solução de di-hidrocloreto de o-dianisidina (0,167 mg/mL contendo 0,005% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A atividade da MPO foi mensurada cineticamente em leitor de microplaca a 460 nm por um período de 5 minutos. Os resultados foram expressos como unidade de MPO por sítio de orelha. Uma unidade de MPO foi considerada como a quantidade de enzima suficiente para degradar 1 mmol de peróxido de hidrogênio/minuto.

#### 4.10.5 Análise histológica das orelhas

Para a análise histológica, o modelo de edema foi induzido conforme item 4.10.2 e as orelhas tratadas com a maior dose do EAAM (3 mg/orelha) ou controle positivo (dexametasona, 0,05 mg/orelha). Após eutanásia dos animais, suas orelhas foram cuidadosamente retiradas e fixadas em formaldeído (10%) até o momento da realização dos cortes histológicos. Posteriormente, as orelhas foram desidratadas, incluídas em parafina e em seguida seccionadas transversalmente em um

micrótomo em cortes de 5  $\mu\text{m}$  de espessura. Estes cortes foram fixados em lâminas e corados com hematoxilina e eosina.

Fotografias histológicas foram capturadas e avaliadas por patologista experiente a fim de determinar parâmetros indicativos de alterações histopatológicas, incluindo infiltrado de células inflamatórias e espessura dérmica. Esta avaliação foi realizada no Instituto de Tecnologia e Pesquisa da Universidade Tiradentes, com a colaboração do Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior.

Para avaliação do número médio de células inflamatórias, um total de 15 campos por animal foi analisado com aumento de 400x. Para obter a espessura da derme, foi realizada a análise quantitativa de imagens randomizadas de três cortes histológicos (quatro medidas/corte) de cada animal. As análises foram realizadas com o auxílio do software UTHSCSA Image Tool14® e os resultados expressos como média de células inflamatórias ou espessura da derme por campo histológico.

#### 4.10.6 Quantificação de hidroperóxidos totais

A quantificação de hidroperóxidos totais foi realizada conforme descrito por Jiang e colaboradores (1992). O método se baseia na oxidação de íons ferroso ( $\text{Fe}^{2+}$ ) a íons férricos ( $\text{Fe}^{3+}$ ) em condições ácidas, pelos hidroperóxidos lipídicos. O indicador utilizado foi o xilenol orange que reage com os íons  $\text{Fe}^{3+}$  produzindo um cromóforo azul, o qual pode ser mensurado a 560nm.

Para realização do teste, o reagente de FOX [0,25 mmol/L de xilenol orange, 0,25 mmol/L de  $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , e 4,4 mmol/L de hidroxitolueno butilado (BHT), enriquecido com metanol e ácido sulfúrico (97%)] foi adicionado aos homogenatos das orelhas e incubados por 30 minutos protegido da luz. Em seguida, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante submetido a leitura em espectrofotômetro a 560 nm. O total de hidroperóxidos foi expresso em  $\mu\text{mol/L}$  com coeficiente de extinção molar de  $4,3 \times 10^{-4} \text{ L}/(\text{mol} \cdot \text{cm})$ .

#### 4.10.7 Determinação da atividade da enzima CAT

A atividade da CAT foi determinada pela mensuração do consumo de peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), conforme descrito por Nelson e colaboradores (1972). Para esta análise, após indução do modelo de edema, as orelhas foram tratadas com a maior dose do EAAM (3 mg/orelha) ou controle positivo (dexametasona, 0,05 mg/orelha).

Após homogeneizadas em PBS, as amostras foram centrifugadas a 10000 x g por 30 minutos a 4°C e em seguida adicionado tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,0) ao seu homogeneizado. A reação foi iniciada com a adição de  $H_2O_2$  (0,3 mol/L) e o seu consumo pela CAT foi monitorado por 1 min a 25°C no comprimento de onda de 240nm. A atividade da CAT foi expressa como extinção de  $H_2O_2$  durante 1 minuto a 25°C ( $\Delta E/\text{min}/\mu\text{g}$  proteína). O conteúdo de proteína dos tecidos foi determinado pelo método de Bradford utilizando o reagente de ensaio Bio-Rad®.

#### 4.10.8 Determinação da atividade da enzima superóxido dismutase (SOD)

A atividade da enzima SOD foi avaliada por meio da formação de  $O_2^-$  pela auto-oxidação do pirogalol, conforme descrito por Madesh e colaboradores (1998). Para esta análise, após indução do modelo de edema, as orelhas foram tratadas com a maior dose do EAAM (3 mg/orelha) ou controle positivo (dexametasona, 0,05 mg/orelha).

Em suma, as orelhas coletadas foram homogeneizadas em PBS e centrifugadas a 10000 xg por 30 minutos. Em uma microplaca, foi pipetado o sobrenadante das amostras e em seguida adicionado o tampão fosfato (50 mmol/L, pH 7,4), o tetrazólio (1,25 mmol/L) e o pirogalol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) e agitados por 5 minutos. Subsequentemente, DMSO foi adicionado à mistura, e a absorbância mensurada a 570 nm. A atividade de SOD foi expressa como U/ $\mu\text{g}$  de proteína.

### 4.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos em média  $\pm$  EPM. Para análise estatística dos dados foi utilizado o *GraphPad* Prisma 7.0. A normalidade dos dados foi avaliada

pelo teste de Shapiro-Wilk. Como não houve restrição para aplicação de testes paramétricos, as avaliações foram realizadas usando análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey. Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

## 5 RESULTADOS

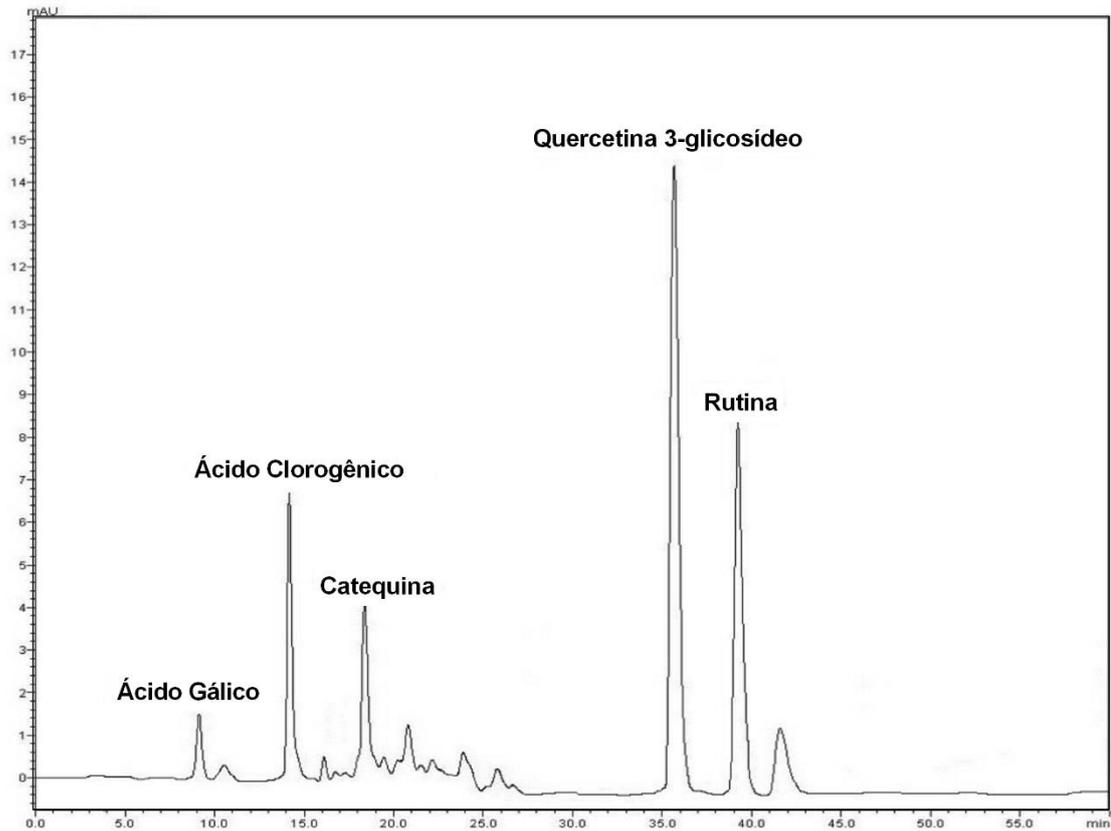
### 5.1 Quantificação de compostos fenólicos e flavonoides totais do EAAM

Foram quantificados compostos fenólicos e flavonoides totais presentes no EAAM das folhas da *Annona muricata* L, sendo determinados  $164,52 \pm 1,13$  mg de equivalente de ácido gálico/g de extrato e  $77,02 \pm 0,00$  mg de equivalente de catequina/g de extrato, respectivamente.

### 5.2 Caracterização de compostos fenólicos por CLAE

O perfil cromatográfico por CLAE do EAAM a 280 nm encontra-se ilustrado na figura 6. Os cinco maiores picos de compostos fenólicos identificados neste cromatograma foram quercetina 3-glicosídeo, rutina, ácido clorogênico, catequina e ácido gálico, respectivamente. Os resultados da análise quantitativa foram obtidos de acordo com as curvas de calibração para cada composto. Todas as curvas apresentaram coeficiente de correlação  $r_2 \geq 0,999$  e a quantidade de cada pico está descrita na Tabela 1.

**Figura 6** - Análise do extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L. por cromatografia líquida de alta performance ( $\lambda = 280$  nm).



**Tabela 1** - Quantificação dos compostos fenólicos presentes no extrato aquoso das folhas da *Annona muricata* L.

Composto	Coefficiente de Correlação	Conteúdo ( $\mu\text{g/mL}$ ) $\pm$ DP
Ácido Gálico	0,9998	0,53 $\pm$ 0,05
Ácido Clorogênico	0,9990	2,80 $\pm$ 0,02
Catequina	0,9995	2,21 $\pm$ 0,01
Quercetina 3-glucosídeo	0,9999	6,34 $\pm$ 0,01
Rutina	0,9999	3,57 $\pm$ 0,04

### 5.3 Avaliação da atividade antioxidante do EAAM *in vitro*

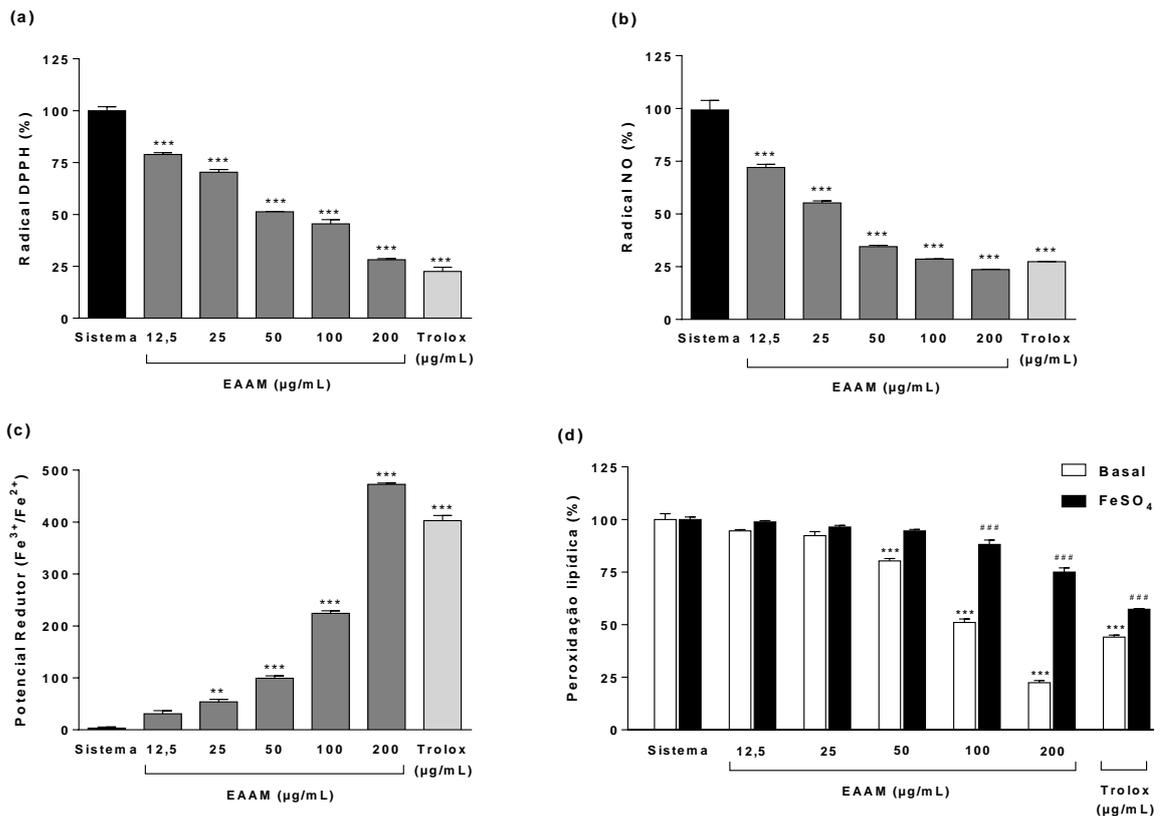
A capacidade antioxidante do EAAM por inibição do radical DPPH encontra-se representada na figura 7(a). Em todas as concentrações do extrato (12,5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL) houve redução significativa do percentual de radical DPPH, quando comparado ao sistema. O Trolox (100 µg/mL) também reduziu este radical propiciando inibição de 87,5% ( $p < 0,001$ ). O  $IC_{50}$  calculado foi de 97,1 µg/mL.

A incubação com EAAM (12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/mL) causou significativa atividade de varredura de NO em comparação ao grupo sistema ( $p < 0,001$ ) e o  $IC_{50}$  calculado foi de 44,2 µg/mL. Utilizado como controle, o Trolox (100 µg/mL) também reduziu a formação de nitrito em 81,6% ( $p > 0,001$ ), conforme mostra a Figura 7(b).

O EAAM também demonstrou capacidade antioxidante no método de FRAP. Conforme mostrado na figura 7(c), as concentrações de 25, 50, 100 e 200 µg/mL do extrato aumentaram o potencial redutor quando comparado ao grupo sistema ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ). Em concordância, o Trolox (100 µg/mL) também promoveu este efeito em comparação ao grupo sistema ( $p < 0,001$ ).

Por fim, a figura 7(d) apresenta a inibição da peroxidação lipídica basal e induzida em cérebro de ratos. A incubação com o EAAM reduziu a peroxidação basal para as doses de 50, 100 e 200 µg/mL quando comparados ao grupo sistema ( $p < 0,001$ ). Nas concentrações de 100 e 200 µg/mL, o extrato inibiu a peroxidação lipídica induzida por  $FeSO_4$  ( $p < 0,001$ ), assim como o Trolox (100 µg/mL,  $p < 0,001$ ). O valor calculado do  $IC_{50}$  foi de 122,8 µg/mL e 401,5 µg/mL para peroxidação lipídica basal e induzida por  $FeSO_4$ , respectivamente.

**Figura 7-** Atividade antioxidante *in vitro* do extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).

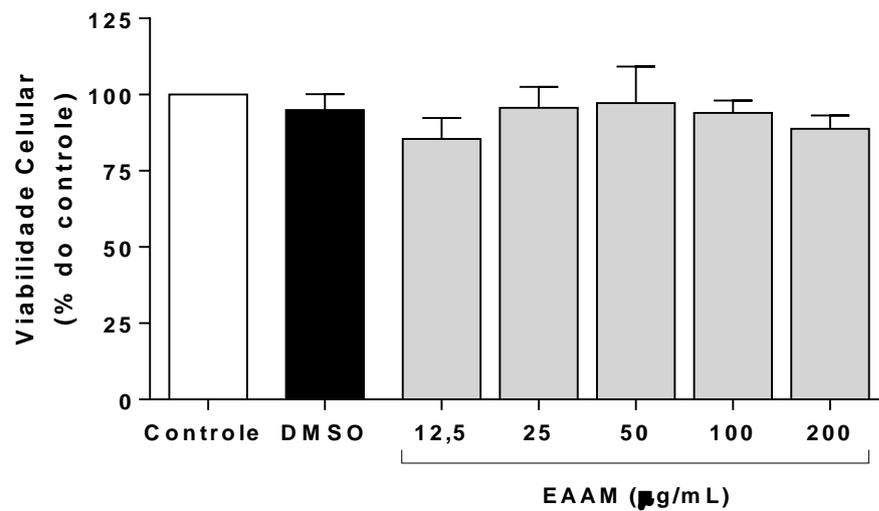


Diferentes concentrações (estoque) do EAAM foram testadas no ensaio do radical DPPH (a), radical NO (b), potencial redutor de ferro (c) e peroxidação lipídica basal e induzida por FeSO<sub>4</sub> (d). Os resultados representam a média ± EPM dos valores de inibição *in vitro*; n=3 experimentos realizados em duplicatas. Trolox foi utilizado como antioxidante padrão. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey; \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 ou ### p<0,001 vs. respectivo sistema (meio reacional sem antioxidante).

#### 5.4 Avaliação da viabilidade celular e da liberação de ERO em fibroblastos L929

A viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados com EAAM foi determinada pelo ensaio de MTT. Estas células foram tratadas com diferentes concentrações do extrato (12,5; 25, 50, 100 e 200 µg/mL) por 24 horas. Os resultados mostraram que para todas as concentrações, o EAAM não alterou a viabilidade celular dos fibroblastos (93,3±7,1; 95,6±6,8; 97,2±11,9; 94,0±4,1 e 88,8±4,3%, respectivamente) comparadas ao grupo controle.

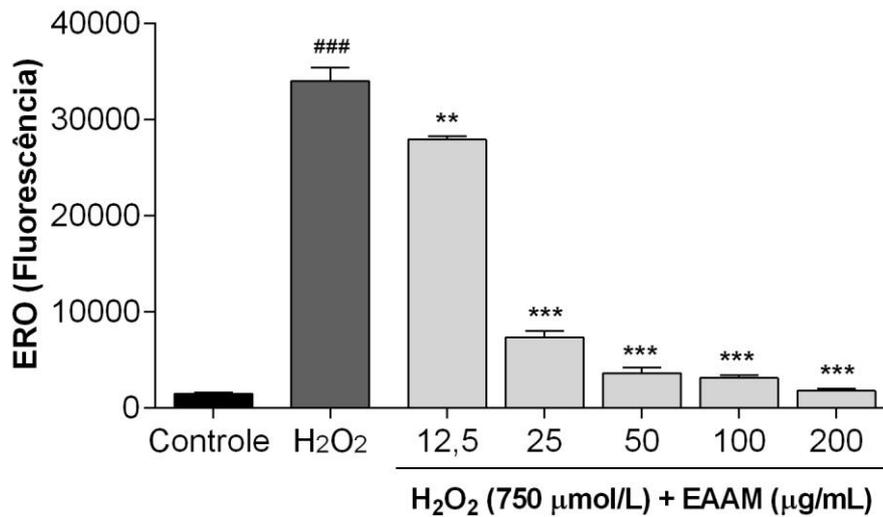
**Figura 8** - Viabilidade celular de fibroblastos L929 tratados com extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).



Os valores representam a média  $\pm$  E.P.M. do percentual de viabilidade para 3 experimentos/tratamento realizados em triplicata, com os percentuais calculados em relação ao controle. ANOVA de uma via. DMSO: dimetilsulfóxido.

O efeito do EAAM sob a liberação de ERO também foi avaliado em linhagem de fibroblastos L929. Os resultados demonstraram que nas células tratadas com o agente estressor ( $H_2O_2$ , 750  $\mu\text{mol/mL}$ ) a liberação de espécies reativas de oxigênio foi aumentada comparadas às células controle ( $p < 0,001$ ). Em contraste, nas células estimuladas pelo  $H_2O_2$  que receberam o tratamento com EAAM (12,5; 25, 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$ ) houve menor liberação de ERO em comparação às células apenas estimuladas com  $H_2O_2$  ( $p < 0,01$  ou  $p < 0,001$ ), conforme mostra a figura 9.

**Figura 9** - Liberação de espécies reativas de oxigênio em fibroblastos L929 tratados com extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).



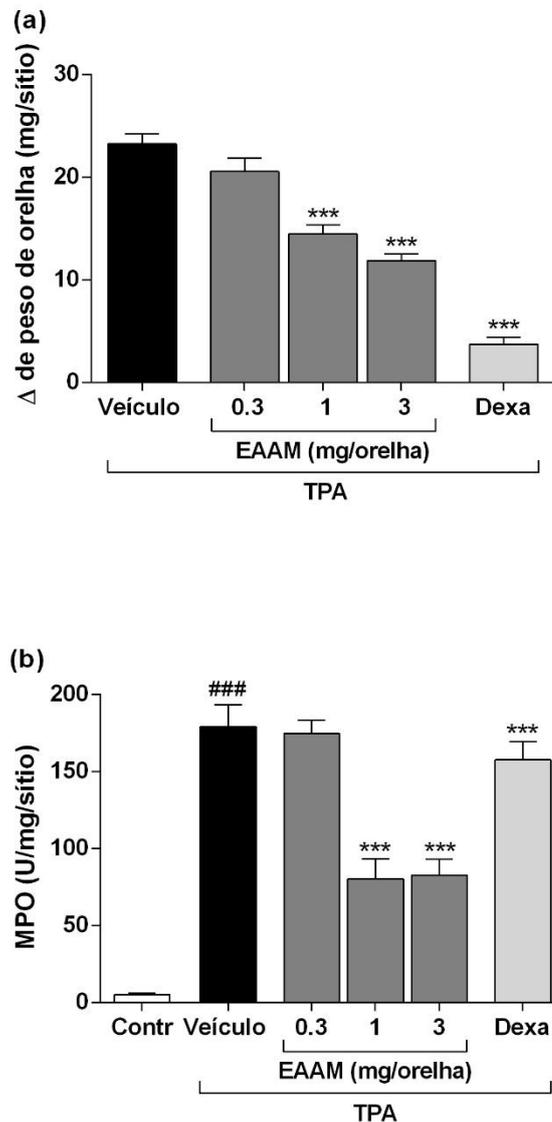
Os resultados representam a média  $\pm$  EPM dos valores de fluorescência; n=2 experimentos realizados em duplicatas. ###p<0,001 vs. controle; \*\*p<0,01 ou \*\*\*p<0,001 vs. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + veículo. ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey.

### 5.5 Avaliação de efeito anti-inflamatório do EAAM *in vivo*

A atividade anti-inflamatória tópica do EAAM foi testada no modelo de edema de orelha induzido por TPA. Nos animais submetidos ao tratamento com o extrato nas doses de 1 e 3 mg/orelha, foi observada menor formação de edema, representado pela redução da variação da massa da orelha direita em relação à esquerda (apenas acetona), em comparação aos animais que receberam TPA apenas com o veículo (p<0,001). Efeito semelhante ocorreu nos animais tratados topicamente com a dexametasona (0,05 mg/orelha; p<0,001), representado na figura 10(a).

Concordando com o resultado anterior, nos animais submetidos ao tratamento com EAAM (1 e 3 mg/orelha) foi encontrada menor atividade da MPO, em comparação em ao grupo TPA tratado apenas com veículo (p<0,001). O mesmo resultado foi visualizado para o tratamento com a dexametasona (p<0,001), conforme mostra a figura 10(b).

**Figura 10** - O extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM) reduz a inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol--13-acetato (TPA) na orelha de camundongos.



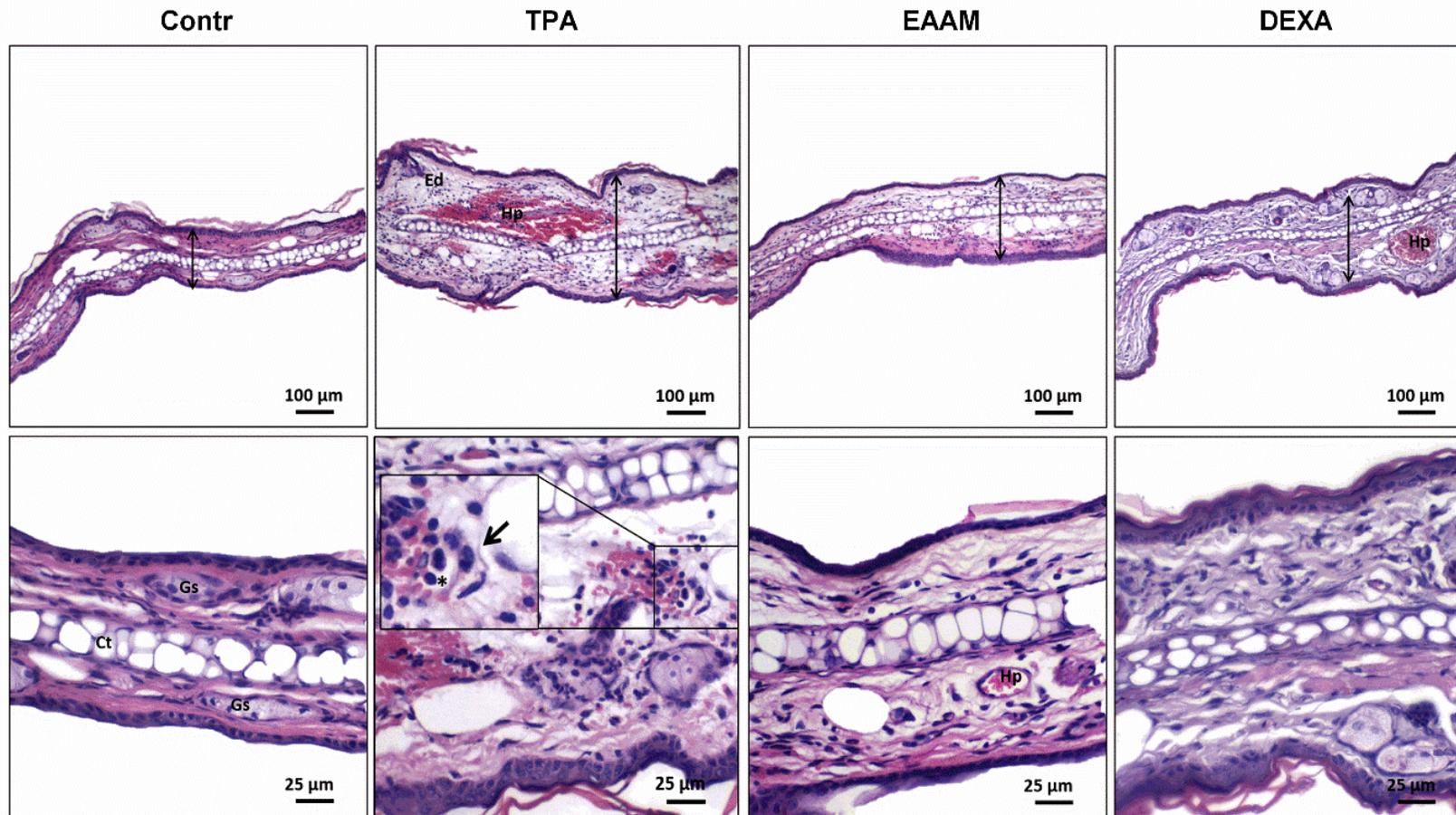
Os animais foram submetidos à indução da inflamação tóxica por TPA e tratados com EAAM (0,3; 1 ou 3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa). A variação ( $\Delta$ ) do peso da orelha (a) e a atividade da mieloperoxidase (MPO) (b) foram mensurados 6 horas após a indução. Orelhas do grupo controle (Contr) receberam apenas administração do veículo. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8); ANOVA de uma via seguido do pós-teste de Tukey; <sup>###</sup> p<0,001 vs. grupo Contr; <sup>\*\*\*</sup> p<0,001 vs. grupo veículo.

As análises histológicas das orelhas encontram-se representadas na figura 11. Ao avaliar o grupo que recebeu acetona como veículo, foram observados tecidos sem alterações morfológicas indicativas de processo inflamatório. Nos animais submetidos a administração tóxica de TPA foram observados importante presença de edema, infiltrado de leucócitos e hiperemia. No grupo de animais que recebeu

administração de TPA e foram tratados com o extrato na sua maior dose (3 mg/orelha) ou com a dexametasona, foi possível observar presença de edema e infiltrado de leucócitos, mas de forma atenuada em comparação ao grupo TPA. Estes parâmetros foram avaliados qualitativamente por um patologista de forma encoberta.

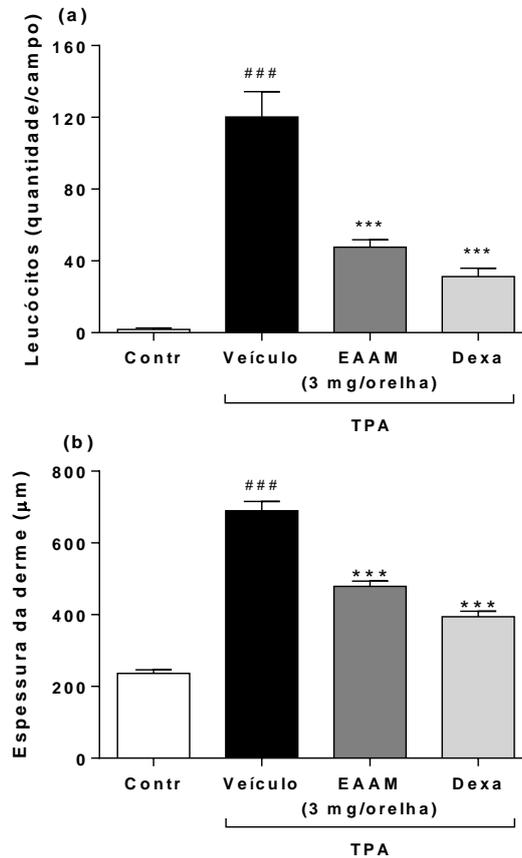
Além disso, a análise quantitativa desses parâmetros pode ser visualizada na figura 12, na qual é demonstrado que tanto o tratamento com o EAAM quanto com a dexametasona reduziu o número de leucócitos e a espessura da derme nas orelhas, comparados ao grupo veículo ( $p < 0,001$ ).

**Figura 11** - Imagens representativas de alterações histopatológicas em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).



As orelhas foram induzidas à inflamação por TPA e tratadas com EAAM (3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa). Imagens histológicas representativas da orelha nos aumentos de 100x (a-d) e 400x (e-h). Legenda: Ct: cartilagem hialina; Gs: glândulas sebáceas; Ed: edema intersticial; Hp: hiperemia; Seta: infiltrado de leucócitos; Seta dupla: espessura do tecido dérmico. Orelhas do grupo controle (Contr) receberam apenas administração do veículo.

**Figura 12** - O extrato aquoso de folhas de *Annona muricata* L. (EAAM) reduziu número de células inflamatórias e espessura da derme em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA).



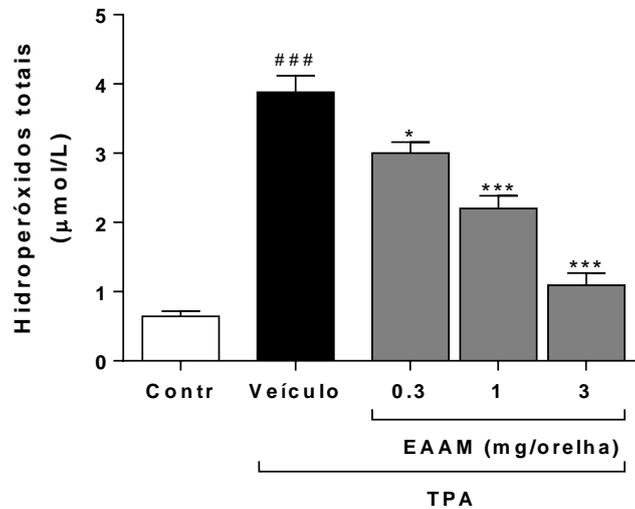
As orelhas foram induzidas à inflamação por TPA e tratadas com EAAM (3 mg/orelha) ou dexametasona (Dexa). Orelhas do grupo controle (Contr) receberam apenas administração do veículo. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=7-8); <sup>###</sup> p<0,001 vs. grupo Contr; <sup>\*\*\*</sup> p<0,001 vs. grupo veículo.

## 5.6 Avaliação da atividade antioxidante do EAAM *in vivo*

Como forma de avaliar uma possível atividade antioxidante mediando os efeitos anti-inflamatórios tópicos do EAAM, foi investigado um parâmetro de alteração oxidativa, o conteúdo tecidual de hidroperóxidos totais, no modelo de edema de orelha induzida por TPA, conforme demonstrado na figura 13. A aplicação de TPA aumentou a formação de hidroperóxidos totais em comparação a orelha contralateral que recebeu apenas acetona (p<0,001). Por outro lado, nas orelhas dos animais com a administração tópica do EAAM nas doses de 0,1; 1 e 3 mg/orelha

subsequente ao TPA foi observada concentração de hidroperóxidos totais menor em comparação ao grupo veículo ( $p < 0,05$  ou  $p < 0,001$ ).

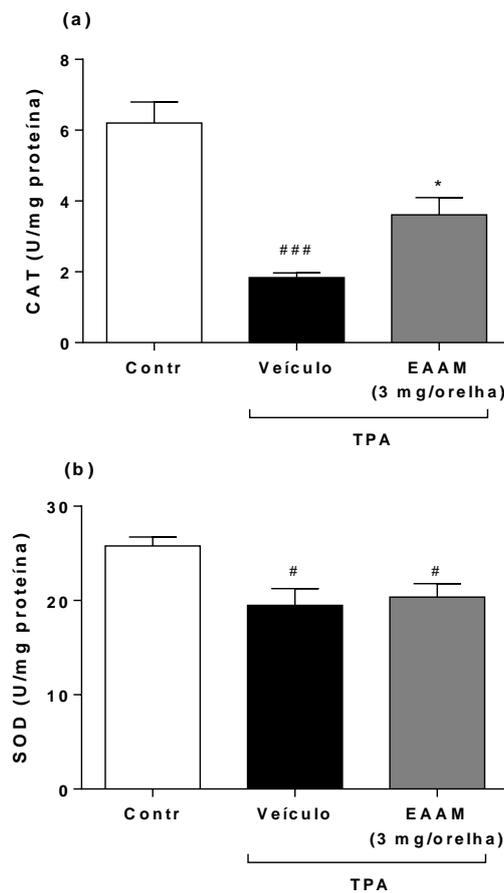
**Figura 13** - Concentração de hidroperóxidos totais em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).



Os camundongos foram submetidos à inflamação da orelha causada por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratados com EAAM (0,3; 1 ou 3 mg/ouvido) ou dexametasona (Dexa). A concentração de hidroperóxidos totais foi expressa como média  $\pm$  EPM ( $n = 8$ ). Orelhas do grupo controle (Contr) receberam apenas administração do veículo. ###  $p < 0,001$  vs. grupo Contr; \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  ou \*\*\*  $p < 0,001$  vs. Grupo TPA+veículo.

Além disso, foram analisadas as atividades das enzimas antioxidantes CAT e superóxido dismutase. Para a CAT, foi observada menor atividade no grupo administrado TPA quando comparado ao grupo controle. No entanto, nos animais tratados com o EAAM (3 mg /orelha) de forma subsequente ao TPA foi verificada maior atividade de CAT quando comparada ao grupo TPA + veículo ( $p < 0,05$ ), conforme apresentado na figura 14(a). O mesmo efeito do EAAM não pode ser observado para a SOD. Embora a administração de TPA permitiu observar menores valores de atividade desta enzima nas orelhas, estes valores não foram alterados significativamente em animais tratados com o EAAM (3 mg /orelha) de forma subsequente ao TPA em comparação ao grupo veículo + TPA (Figura 14(b)).

**Figura 14** - Atividade de enzimas antioxidantes em orelhas de camundongos inflamadas por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratadas com extrato aquoso da *Annona muricata* L. (EAAM).



Os camundongos foram submetidos à inflamação da orelha causada por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) e tratados com EAAM (0,3; 1 ou 3 mg/ouvido) ou dexametasona (Dexa). A atividade da catalase (CAT; a) e superóxido dismutase (SOD; b) foram mensuradas. Orelhas do grupo controle (Contr) receberam apenas administração do veículo. Os dados são expressos como média  $\pm$  EPM (n=8). #  $p < 0,05$  ou ###  $p < 0,001$  vs. grupo Contr; \*  $p < 0,05$  vs. grupo veículo.

## 6 DISCUSSÃO

No presente estudo, o EAAM foi preparado e seu perfil fitoquímico e efeito antioxidante *in vitro* contra radicais, peroxidação lipídica ou em fibroblastos L929 submetidos a condição oxidante foram descritos. Ao mesmo tempo, seus efeitos anti-inflamatório e antioxidante tópicos foram demonstrados em um modelo de inflamação cutânea em camundongos.

Além da análise quantitativa para conteúdo de fenólicos totais e flavonoides totais encontrados no EAAM por meio de ensaios colorimétricos, a caracterização fitoquímica do extrato permitiu identificar 5 compostos fenólicos (quercetina-3-glicosídeo, rutina, ácido clorogênico, catequina e ácido gálico), dentre eles 3 flavonoides. Esses compostos foram descritos anteriormente em preparações da *A. muricata* (WAHAB et al., 2018), sendo também comumente encontrados em alimentos, como frutas, legumes e verduras. Dessa forma, destaca-se a importância do consumo alimentar dos polifenóis, visto que este está associado a redução do estresse oxidativo e manutenção da homeostase do sistema redox (HUSSAIN et al., 2016).

Nos últimos anos, diversos trabalhos de revisão têm sido publicados descrevendo as propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos e seus possíveis mecanismos de ação. Dentre eles, destacamos os flavonoides identificados no EAAM, quercetina (XU et al., 2019), rutina (ENOGIERU et al., 2018) e catequina (BERNATONIENE; KOPUSTINSKIENE, 2018). Latos-brozio e Masek (2019) em seu estudo, relatam que a estrutura química desses compostos é um dos fatores que determinam as suas propriedades contra o estresse oxidativo e que estes mesmos elementos estruturais estão envolvidos em suas atividades farmacológicas. Neste contexto, Olszowy (2019) traz com detalhes os principais mecanismos responsáveis por esse potencial efeito antioxidante, enfatizando que a eficácia destes compostos aromáticos é proporcional ao número de grupos –OH presentes em seus anéis. Dependendo do arranjo dos grupos –OH, esses compostos podem transferir elétrons neutralizando radicais livres, quelar ou reduzir metais pró-oxidativos e ativar enzimas antioxidantes.

Estes constituintes fenólicos são considerados um dos mais importantes constituintes terapêuticos das folhas da *A. muricata*, principalmente por que a sua maioria são solúveis em água, sendo a infusão aquosa a preparação comumente usada na medicina popular (CORIA-TÉLLEZ et al., 2018; GAVAMUKULYA et al., 2017). Portanto, a presença de polifenóis no EAAM, em especial os flavonoides, indica potencial atividade antioxidante deste extrato (MANRIQUE-DE-LA-CUBA et al., 2019).

Essa possibilidade foi confirmada *in vitro* para o EAAM, uma vez que foi capaz de reduzir radicais, como DPPH e NO, indicando que os compostos presentes no extrato podem atuar como doadores de íons  $H^+$  em reação com DPPH ou apresentar capacidade de eliminação de NO. Além disso, os dados mostraram potencial redutor por meio do ensaio de FRAP, um método em que a substância antioxidante promove redução do  $Fe^{3+}$  (forma férrica) em sua forma ferrosa ( $Fe^{2+}$ ) (PULIDO et al., 2000).

Esta descoberta é relevante visto que as reações oxidantes catalisadas por  $Fe^{2+}$  podem gerar radicais hidroxila (por exemplo, pela reação de Fenton), que são altamente prejudiciais às células (VALKO et al., 2016). Finalmente, o efeito antioxidante do EAAM foi também demonstrado pela redução da peroxidação lipídica, que é formado a partir de ERO e outros produtos de oxidação secundária (MOON; SHIBAMOTO, 2009). A peroxidação lipídica no presente trabalho foi mensurada usando a reação do ácido tiobarbitúrico (TBA), a qual leva em consideração a formação produtos como hidroperóxidos lipídicos e o malonaldeído, considerado um importante marcador de estresse oxidativo (VACA; WILHELM; HARMS-RINGDAHL, 1988; MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

A peroxidação lipídica de organelas e membranas celulares, dentre vários efeitos deletérios às diversas células do corpo, está relacionada a alterações em células endoteliais, fibroblastos, metabolismo do colágeno em queratinócitos e permeabilidade capilar o que pode interferir por exemplo no processo de cicatrização de feridas (ALTAVILLA et al., 2001). É bem estabelecido na literatura a estreita relação entre a modulação positiva no equilíbrio redox intracelular, especialmente no tocante as enzimas antioxidantes, e a diminuição na peroxidação lipídica, e conseqüentemente nos seus efeitos lesivos (VALKO et al., 2007; MD RODUAN et al., 2017).

Em consonância, os dados do presente estudo indicam ação antioxidante do EAAM, o que corrobora observações anteriores para preparações de *A. muricata* conforme abordado em estudos de revisão de outros autores (CORIA-TELLEZ et al., 2018; GAVAMUKULYA et al., 2017; MOGHADAMTOUSI et al., 2015). Neste contexto, Gavamukulya e colaboradores (2014) mostraram que os extratos etanólico e aquoso das folhas *A. muricata* promoveram redução do radical DPPH, apresentando alto poder antioxidante para o extrato aquoso. Adicionalmente, estes extratos também preveniram a oxidação do íon férrico, indicado pelo ensaio de FRAP (AGU; OKOLIE, 2017). Além disso, Justino e colaboradores (2018) além de trazer o efeito antioxidante do extrato etanólico das folhas de *A. muricata* nos métodos de DPPH e FRAP, também revelou redução da peroxidação lipídica pela diminuição da formação de TBARS.

A partir desses dados, avaliamos o EAAM em cultura de células e observamos que este extrato reduziu a liberação de ERO em fibroblastos L929, o que reforça a possibilidade de efeitos protetores contra o estresse oxidativo. Neste contexto, vale lembrar que a produção excessiva de espécies reativas pode iniciar processos inflamatórios, com produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, quimiocinas, como MCP-1 (proteína quimioatraente de monócitos-1) e ativação do fator nuclear  $\kappa$ B, contribuindo para o desenvolvimento de outros processos patológicos (BECKER et al., 2014).

Além disso, EAAM não afetou a viabilidade em culturas de fibroblastos L929. Este resultado merece atenção visto que alguns pesquisadores sugeriram efeito tóxico causado pelas acetogeninas presentes nas preparações de *A. muricata* (ESCOBAR-KHONDIKER et al., 2007; WAHAB et al., 2018; YANG et al., 2015). Porém, Quilez e colaboradores (2015) mostraram que o extrato produzido a partir da decocção das folhas da *A. muricata* nas concentrações de 500, 250 e 100  $\mu$ g/mL não causou citotoxicidade em macrófagos isolados de camundongos.

Diante dos resultados obtidos nos modelos *in vitro* utilizados no presente estudo e dos benefícios anti-inflamatórios descritos na literatura para os compostos fenólicos (TRESSERRA-RIMBAU et al., 2018), propomos que o EAAM pode produzir efeitos anti-inflamatórios tópicos possivelmente associados ao seu perfil antioxidante

*in vivo*. Assim, utilizamos o modelo de inflamação da orelha induzida por TPA a fim de avaliar essa possibilidade.

A resposta inflamatória cutânea gerada pela aplicação tópica de TPA é classicamente caracterizada pela formação de edema transitório, infiltração de células inflamatórias e hiperplasia celular epidérmica, respostas essas facilmente reproduzíveis e mensuráveis em laboratório, o que contribui para sua ampla utilização em estudos de prospecção de efeitos terapêuticos de novos compostos com potencial anti-inflamatório (YOUNG; WAGNER; SPIRES, 1983; HUANG et al., 1988; MURAKAWA et al., 2006). Outra vantagem importante na utilização de um modelo onde a aplicação da droga teste é tópica, é a necessidade de pequenas quantidades da substância teste e a avaliação de eventuais efeitos tóxicos no caso de substâncias ainda pouco estudadas (GÁBOR, 2002; GÁBOR, 2012).

Foi observado que o tratamento com EAAM reduziu o edema de orelha e a atividade da MPO. Esses achados corroboram a análise histológica, na qual mostrou redução da espessura da derme e da contagem de leucócitos totais nas orelhas tratadas com o extrato. Nossos resultados estão de acordo com estudo anterior que mostrou efeito antiedematogênico do extrato produzido a partir da decocção das folhas da *A. muricata* em doses de 2,5 e 5 mg/orelha, acompanhadas da redução da atividade da MPO no mesmo modelo utilizado no presente estudo (QUILEZ et al., 2015). No entanto, esses autores não discutiram qualquer mecanismo para os efeitos descritos.

Outros estudos também relataram atividade anti-inflamatória da *A. muricata*. De Sousa e colaboradores (2010) mostraram que o tratamento com extrato etanólico de folhas dessa planta reduziu o edema de pata induzido por carragenina, seguido da diminuição do exsudato pleural e da infiltração de leucócitos na pleurisia induzida também por carragenina em ratos. Além disso, o tratamento tópico com extrato de acetato de etila da *A. muricata* melhorou a cicatrização de feridas induzida por excisão não infectada, reduzindo a infiltração de neutrófilos e macrófagos e aumentando a deposição de colágeno (MOGHADAMTOUSI et al., 2015).

Conforme descrito anteriormente, é possível afirmar que antioxidantes naturais, são capazes de reduzir o processo inflamatório (HUSSAIN et al., 2016). A literatura destaca que essa propriedade pode ocorrer por mecanismos diferentes.

Dentre eles, eliminação de radicais livres associada a quelação de íons metálicos oxidativos, modulação da cadeia respiratória mitocondrial e inibição de NOS; inibição de enzimas que catalisam a produção de ERO, como a xantina oxidase e NADPH oxidase; além de aumentar a atividade das enzimas antioxidantes, como a SOD, a CAT e a glutathione peroxidase (YAHFOUFI et al., 2018).

Curiosamente, estudos anteriores mostraram que os compostos identificados no EAAM causaram efeitos antiedematogênicos nas orelhas de roedores. A administração tópica de quercetina-3-glicosídeo (isoquercitrina) reduziu o edema de orelha induzido por óleo de cróton (0,14 e 0,46 mg/orelha; SOSA et al., 2007) ou xileno (0,02 mg/orelha; Fu et al., 2020); assim como a rutina (0,01 e 0,03 mg/orelha; CAMPONOOGARA et al., 2020) ou catequina (a 0,6 mg/orelha; PIETROVSKI et al., 2008) no edema de orelha também induzido por óleo de cróton. Por outro lado, no modelo de edema de orelha induzido por xileno, o efeito do ácido clorogênico e da rutina contra a formação de edema foi demonstrado após administração oral nas doses de 10–15 mg/kg e 2,5–10 mg/kg, respectivamente (TORRES-RÊGO et al., 2016). Com base nesses resultados, é possível reforçar a ideia de que a ação anti-inflamatória do EAAM pode se dar, em grande parte, pela ação dos compostos fitoquímicos presentes no mesmo.

Ainda neste estudo, observamos redução da atividade de MPO após administração do EAAM, sugerindo redução de neutrófilos nas orelhas inflamadas e tratadas. É amplamente conhecido que neutrófilos participam da primeira linha de defesa contra agentes patogênicos e liberam grânulos contendo peroxidases, como a MPO. Essas enzimas produzem ERO utilizando o  $H_2O_2$  produzido pela NADPH oxidase, o qual leva à peroxidação lipídica (OSAWA, 2017). Assim, a diminuição da atividade da MPO pelo EAAM pode estar diretamente ligada à inibição do estresse oxidativo causada pela redução direta na formação de espécies reativas, possivelmente promovida pelos seus compostos.

No presente trabalho também observamos que o tratamento com o extrato da *A. muricata* reduziu a concentração de hidroperóxidos totais nas orelhas inflamadas, o qual pode ser considerado um marcador de alteração oxidativa nas membranas (OSAWA, 2017). Esse achado concorda com estudos que demonstraram relação direta da peroxidação lipídica com a patogênese do edema induzido por TPA, bem como a inibição dessa por compostos fenólicos como os flavonoides (HIDEAKI et al.,

1992; HUANG et al., 1988; YASUKAWA et al., 1989), sendo este efeito relacionado possivelmente a interferência desses compostos no metabolismo do ácido araquidônico. Adicionalmente, a manutenção da homeostase antioxidante, tanto enzimática quanto não enzimática, é também de grande importância na proteção contra as modificações oxidativas de membranas (MD RODUAN et al., 2017).

Nesse ínterim, uma modulação positiva da atividade das enzimas antioxidantes representa outro mecanismo de proteção contra o estresse oxidativo associado a resposta inflamatória. Elas catalisam reações químicas que transformam espécies altamente reativas, que danificam a estrutura das células, em compostos mais estáveis (BRESCIANI et al., 2015). Neste estudo, finalmente foi avaliado o papel do EAAM sob a modulação das enzimas CAT e SOD. Curiosamente, foi observado que o tratamento com EAAM modulou a atividade da CAT, que pode ter contribuído para a redução do estresse oxidativo, uma vez esta enzima catalisa a conversão de peróxido de hidrogênio em água e O<sub>2</sub> (BRESCIANI et al., 2015). Porém, o mesmo efeito não foi detectado para a atividade da SOD. Em parte, estes resultados concordam com os achados de Moghadamtousi e colaboradores (2015), o qual encontrou efeitos da *A. muricata* na cicatrização de feridas, promovidos pela modulação da atividade das enzimas CAT, SOD e glutathiona peroxidase. Portanto, esses dados fortalecem a hipótese do potencial antioxidante do EAAM e a sua relação protetora diante da inflamação cutânea. Não obstante, faz-se necessário a realização de ensaios futuros a fim de investigar mecanismos adicionais e vias envolvidas no efeito antioxidante evidenciado neste trabalho.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, o presente trabalho demonstrou:

- A identificação de cinco compostos fenólicos presentes no EAAM, dentre eles os flavonoides quercetina-3-glicosídeo, rutina e catequina;
- A atividade antioxidante do EAAM *in vitro* representada pelos ensaios de DPPH, NO, FRAP e TBARS;
- A atividade antioxidante do EAAM em cultura de células;
- A ausência de citotoxicidade do EAAM em fibroblastos L929;
- A atividade anti-inflamatória do EAAM no modelo animal de inflamação de orelha;
- A atividade antioxidante do EAAM no modelo animal de inflamação de orelha, demonstrada pela redução de hidroperóxidos totais e modulação da atividade de CAT.

Os achados obtidos neste estudo, em conjunto, demonstram o efeito anti-inflamatório da aplicação tópica do EAAM no modelo de edema de orelha induzido por TPA, via inibição do estresse oxidativo e modulação de antioxidantes endógenos. Assim, o EAAM representa uma alternativa terapêutica contra doenças inflamatórias cutâneas por via tópica ao demonstrar ausência de citotoxicidade e redução de parâmetros inflamatórios associados à manutenção da homeostase redox.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDILLAH, S.; TAMBUNAN, R. M.; FARIDA, Y. et al. Phytochemical screening and antimalarial activity of some plants traditionally used in Indonesia. **Asian Pac. J. Trop. Dis.**, v. 5, p. 454–457, 2015.

ADEWOLE, S. O.; OJEWOLE, J. A. O. Protective effects of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) leaf aqueous extract on serum lipid profiles and oxidative stress in hepatocytes of streptozotocin-treated diabetic rats. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines: AJTCAM**, v. 6, n. 1, p. 30–41, 25 out. 2008.

AGU, K.; OKOLIE, P. N. Proximate composition, phytochemical analysis, and in vitro antioxidant potentials of extracts of *Annona muricata* (Soursop). **Food Sci Nutr.** v. 5, n.5, p.1029-1036, 2017.

ALA, A.; DHILLON, A. P; HODGSON, H. J. Role of cell adhesion molecules in leukocyte recruitment in the liver and gut. **Int J Exp Pathol.**, v. 84, n.1, p.1-16, 2003.

ALI, S. S; AHSAN, H; ZIA, M. K; SIDDIQUI, T; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **J Food Biochem.**, v. 44, p.e13145, 2020.

ALTAVILLA, D. et al. Inhibition of lipid peroxidation restores impaired vascular endothelial growth factor expression and stimulates wound healing and angiogenesis in the genetically diabetic mouse. **Diabetes**, v. 50, n. 3, p. 667–674, 2001.

ALSENOSY, A. A. et al. Graviola (*Annona muricata*) attenuates behavioural alterations and testicular oxidative stress induced by streptozotocin in diabetic rats. **Plos One**, v. 14, n. 9, p. e0222410, 2019.

ANSARI, M. Y; AHMAD, N; HAQQI, T. M. Oxidative stress and inflammation in osteoarthritis pathogenesis: Role of polyphenols. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 129, p. 110452, 2020.

AROLA-ARNAL, A. et al. Chrononutrition and polyphenols: Roles and diseases. **Nutrients**, v. 11, n. 11, p. 2602, 2019.

ARULSELVAN, P. et al. Role of antioxidants and natural products in inflammation. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016.

AYALA-FONTÁNEZ, N.; SOLER, D. C.; MCCORMICK, T. S. Current knowledge on psoriasis and autoimmune diseases. **Psoriasis (Auckland, N.Z.)**, v. 6, p. 7–32, 22 fev. 2016.

BASU, S; HAZRA, B. Evaluation of nitric oxide scavenging activity, in vitro and ex vivo, of selected medicinal plants traditionally used in inflammatory diseases. **Phytother Res.** v. 20, n. 10, p. 896-900, 2006.

BAUMANN, H; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol Today**. v. 15, p.74–80, 1994.

BECKER, K. et al. Comparison of in vitro tests for antioxidant and immunomodulatory capacities of compounds. **Phytomedicine**, v. 21, n.2, p. 164–171, 2014.

BERNATONIENE, J; KOPUSTINSKIENE, D. M. The role of catechins in cellular responses to oxidative stress. **Molecules**, v. 23, n.4, p. 965, 2018.

BRESCIANI, G.; DA CRUZ, I. B. M.; GONZÁLEZ-GALLEGO, J. Manganese Superoxide Dismutase and Oxidative Stress Modulation. **Advances in Clinical Chemistry**, p. 87–130, 2015.

BROOM, L. J; KOGUT, M. H. Inflammation: friend or foe for animal production?. **Poult Sci**. v. 97, n. 2, p. 510-514, 2018.

CALDER, P. C. n-3 Polyunsaturated fatty acids, inflammation, and inflammatory diseases. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 83, n. 6, p. 1505S–1519S, 2006.

CAMPONOGARA, C. et al. Casearia decandra leaves present anti-inflammatory efficacy in a skin inflammation model in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 249, p. 112436, 2020.

CARLBERG, C; ULVEN, S. M; MOLNÁR, F. Chronic inflammation and metabolic stress nutrigenomics. **Springer**, p. 121–137, 2016.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15–25, 2013.

CAZAROLLI, L.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. et al. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 8, n. 13, p. 1429–1440, 2008.

CHAMPY P. et al. Annonacin, a lipophilic inhibitor of mitochondrial complex I, induces nigral and striatal neurodegeneration in rats: possible relevance for atypical parkinsonism in Guadeloupe. **J. Neurochem**. v. 88, p. 63–69, 2004.

CHAN, P.; AH, R.; MH, K. Anti-arthritic activities of *Annona muricata* L. Leaves extract on complete freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis in rats. **Planta Med.**, v. 76, p. 166, 2010.

CHEESEMAN, K. H. Lipid peroxidation in biological systems. In: Halliwell B, Aruoma OI, ed. DNA and Free Radicals. London: Ellis Horwood, 1993.

CHEN, G.; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol**, v. 10, p. 826–837, 2010.

CHIMIN, M.; APTA, B. H. R.; MCGETTRICK, H.M. Introduction: T cell trafficking in inflammation and immunity. In: Rainger G., Mcgettrick H. (eds) T-cell trafficking. **Methods In Molecular Biology**, v. 1591. Humana Press, New York.

CHIRUMBOLO, S. The Role of Quercetin, Flavonols and Flavones in Modulating Inflammatory Cell Function. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 9, n.4, p. 263–285, 2010.

CORIA-TÉLLEZ, A. V. et al. *Annona muricata*: a comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. **Arabian J. Chem.**, 2018.

CORIA-TÉLLEZ, A. V.; Montalvo-González, E.; Obledo-Vázquez, E. N. Soursop (*Annona muricata*). In **Fruit and Vegetable Phytochemicals**, E.M. Yahia (Ed.), 2017.

DAVID, A. V; ARULMOLI, R; PARASURAMAN, S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. **Pharmacogn Rev.** v. 10, n. 20, p. 84-89, 2016.

DE LIMA, M. C; ALVES, R. Soursop (*Annona muricata* L.), in Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits: Mangosteen to White Sapote ed Yahia E., editor. (Sawston: Woodhead Publishing), p. 363–392e, 2016.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J.; YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 26, p. 335-41, 1989.

ENOGIERU, A. B.; HAYLETT, W.; HISS, D. C. et al. Rutin as a Potent Antioxidant: Implications for Neurodegenerative Disorders. **Oxid Med Cell Longev.**, v. 2018, p. 6241017, 2018.

EL-BENNA, J.; HURTADO-NEDELEC, M.; MARZAIOLI, V.; MARIE, J.-C.; GOUGEROT-POCIDALO, M.-A.; DANG, P. M.-C. Priming of the neutrophil respiratory burst: role in host defense and inflammation. **Immunological Reviews**, v. 273, n. 1, p. 180–193. 2016.

ESCOBAR-KHONDIKER, M. et al. Annonacin, a natural mitochondrial complex I inhibitor, causes tau pathology in cultured neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 27, n. 29, p. 7827-7837, 2007.

FEEHAN, K. T.; GILROY, D. W. Is Resolution the End of Inflammation? **Trends in Molecular Medicine**, v. 25, n.3, p. 198-214, 2019.

FENG, Y. W. Metabolism of Green Tea Catechins: An Overview. **Current Drug Metabolism**, v. 7, n. 7, p. 755–809, 2006.

FERRER, J. L.; AUSTIN, M. B.; STEWART, C.Jr. et al. Structure and function of enzymes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids. **Plant Physiol Biochem**, v. 46, n. 3, p. 356–370, 2007.

FU, R.; CHEN, F.; GUO, Y. Anti-inflammatory mechanism and active ingredients of the Chinese tallow tree. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 250, p. 112497, 2020

GÁBOR, M. the mouse ear as a model for cutaneous irritation. **Journal of Toxicology: Cutaneous and Ocular Toxicology**, v. 21, n. 3, p. 191–202, jan. 2002.

GÁBOR, M. Pharmacology and dermatopharmacology of mouse ear inflammation. [s.l: s.n.]. **Akadémiai Kiadó**, Members of Wolters Kluwer Group, Budapest, 2012.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharm J.** v. 25, n. 2, p. 149–164, 2017. 10.1016/j.jsps.2016.04.025

GARCÍA-MEDIAVILLA, V.; CRESPO, I.; COLLADO, P. S. et al The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down-regulation of the nuclear factor kappaB pathway in Chang Liver cells. **Eur J Pharmacol.**, v. 557, n. 2-3, p. 221-9, 2007.

GAVAMUKULYA, Y. et al. Phytochemical screening, anti-oxidant activity and in vitro anticancer potential of ethanolic and water leaves extracts of *Annona muricata* (Graviola). **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v. 7, p. S355-S363, 2014.

GAVAMUKULYA, Y.; WAMUNYOKOLI, F.; EL-SHEMY, H.A. *Annona muricata*: is the natural therapy to most disease conditions including cancer growing in our backyard? A systematic review of its research history and future prospects. **Asian Pac. J. Trop. Med.** v. 10, p. 835–848, 2017.

GEORGE, V. C; KUMAR, D. R.; SURESH, P. K. et al. Antioxidant, DNA protective efficacy and HPLC analysis of *Annona muricata* (soursop) extracts. **J Food Sci Technol.**, v.52, n. 4, p. 2328-35, 2015

GERMOLEC, D. R.; SHIPKOWSKI, K. A.; FRAWLEY, R. P. et al. Markers of Inflammation. **Immunotoxicity Testing**, p. 57–79, 2019.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov.** v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

HAMID, R. A.; FOONG, C. P.; AHMAD, Z. et al. Antinociceptive and anti-ulcerogenic activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 22, p. 630–641, 2012.

HANADA, T.; AYOSHIMURA, Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v.13, n. 4–5, p.413-421, 2002.

HIDEAKI, H. et al. Effects of baicalein and  $\alpha$ -tocopherol on lipid peroxidation, free radical scavenging activity and 12-O-tetradecanoylphorbol acetate-induced ear edema. **European Journal of Pharmacology**, v. 221, n. 2–3, p. 193–198, 1992.

HUANG, M.-T. et al. Inhibitory Effect of Curcumin, Chlorogenic Acid, Caffeic Acid, and Ferulic Acid on Tumor Promotion in Mouse Skin by 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Cancer Research**, v. 48, n. 21, p. 5941–5946, 1988.

HUANG, M.; LU, J. J.; DING, J. Natural Products in Cancer Therapy: Past, Present and Future. **Nat Prod Bioprospect**, 2021. doi: 10.1007/s13659-020-00293-7.

HUSSAIN, T. et al. Oxidative Stress and Inflammation: What Polyphenols Can Do for Us?. **Oxidative medicine and cellular longevity**, 2016, 7432797. <https://doi.org/10.1155/2016/7432797>

ISHOLA I. O; AWODELE, O; OLUSAYERO, A. M; OCHIENG, C. O. Mechanisms of analgesic and anti-inflammatory properties of *Annona muricata* Linn. (Annonaceae) fruit extract in rodents. **J. Med. Food**, v. 17, p. 1375–1382., 2014. 10.1089/jmf.2013.0088

JAVADI, F.; AHMADZADEH, A.; EGHTESEADI, S.; et al. The Effect of Quercetin on Inflammatory Factors and Clinical Symptoms in Women with Rheumatoid Arthritis: A Double-Blind, Randomized Controlled Trial. **J Am Coll Nutr**. v. 36, n. 1, p. 9–15, 2017. 10.1080/07315724.2016.1140093

JUSTINO, A. B.; MIRANDA, N. C.; FRANCO, R. R. et al. *Annona muricata* Linn. leaf as a source of antioxidant compounds with in vitro antidiabetic and inhibitory potential against  $\alpha$ -amylase,  $\alpha$ -glucosidase, lipase, non-enzymatic glycation and lipid peroxidation. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 100, p. 83–92, 2018. doi:10.1016/j.biopha.2018.01.172

KIM G. et al. Immunomodulatory efficacy of standardized *Annona muricata* (Graviola) leaf extract via activation of mitogen-activated protein kinase pathways in RAW 264.7 macrophages. **Evid. Based Complement. Altern. Med.** v. 2016, p. 1–10, 2016. 10.1155/2016/2905127

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

KUMAR, V; ABBAS, A. K; FAUSTO, N. Tissue renewal and repair: regeneration, healing, and fibrosis. In: Kumar V, Abbas AK, Fausto N, editors. *Pathologic Basis of Disease*. Elsevier Saunders; Philadelphia, PA: 2005. pp. 87–118.

LATOS-BROZIO, M; MASEK, A. Structure-Activity Relationships Analysis of Monomeric and Polymeric Polyphenols (Quercetin, Rutin and Catechin) Obtained by Various Polymerization Methods. **Chemistry & Biodiversity**, v. 16, n. 12, p. e1900426, 2019.

LAKSMITAWATI, D. R. et al. Anti-Inflammatory Potential of Gandarusa (*Gendarussa vulgaris* Nees) and Soursoup (*Annona muricata* L) Extracts in LPS Stimulated-Macrophage Cell (RAW264.7). **Journal of Natural Remedies**, v. 16, n. 2, p. 73, 2016.

LECOUR, S.; LAMONT, K. T. Natural polyphenols and cardioprotection. **Mini Rev Med Chem.**, v. 11, n. 14, p. 1191-1199, 2011.

LEI, Y.; WANG, K.; DENG, L. et al. Redox Regulation of Inflammation: Old Elements, a New Story. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 2, p. 306–340, 2014.

LI, A.-N. et al. Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 6020–6047, 2014.

LIBBY, P. M. D. Inflammatory Mechanisms: the Molecular Basis of Inflammation and Disease. **Nutrition Reviews**, v. 65, n. 3, p. S140-146, 2007.

LIU, Z. et al. Role of ROS and Nutritional Antioxidants in Human Diseases. **Front. Physiol.**, v. 9, p. 477, 2018.

LÜ, J.-M.; LIN, P. H.; YAO, Q. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, p. 840-860, 2010.

LUGRIN, J.; ROSENBLATT-VELIN, N.; PARAPANOV, R; LIAUDET, L. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biol Chem.**, v. 395, n. 2, p. 203-230, 2014.

MAHOMOODALLY, M. F; LOBINE, D.; PICOT-ALLAIN, M. C. N; SADEER, N. et al. Conventional and Non-Conventional Targets of Natural Products in the Management of Diabetes Mellitus and Associated Complications. **Current Medicinal Chemistry**, 2020.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Anti-inflammatory effects of flavonoids. **Food Chemistry**, v. 125124, 2019.

MALEKI, S. J.; CRESPO, J. F.; CABANILLAS, B. Efeitos antiinflamatórios dos flavonóides. **Química alimentar** , v. 299, p. 125124, 2019.

MANACH. C.; SCALBERT, A.; MORAND, C.; RÉMÉSY, C.; JIMÉNEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Clin Nutr.** v. 79, n. 5, p. 727-747, 2004.

MANRIQUE-DE-LA-CUBA, M. F.; GAMERO-BEGAZO, P.; VALENCIA, D. E. et al. Theoretical study of the antioxidant capacity of the flavonoids present in the *Annona muricata* (Soursop) leaves. **Journal of Molecular Modeling**, v. 25, n.7, 2019.

MARÇO, P. H.; POPPI, R. J.; SCARMINIO, I. S. Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, p. 1218–1223, 2008.

MARION-LETELLIER, R.; SAVOYE, G.; GHOSH, S. Polyunsaturated fatty acids and inflammation. **IUBMB Life**, v. 67, p. 659-667, 2015. d

MASELLA, R.; DI BENEDETTO, R.; VARI, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586., 2005.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428–435, 2008.

MD RODUAN, M. R. et al. *Annona muricata* leaves extracts prevent DMBA/TPA-induced skin tumorigenesis via modulating antioxidants enzymes system in ICR mice. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 481–488, 2017.

MIAO, M.; XIANG, L. Pharmacological action and potential targets of chlorogenic acid. **Adv Pharmacol.**, v. 87, p. 71–88, 2020.

MIDDLETON, E. J. Effect of plant flavonoids on immune and inflammatory cell function. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 439, p.175–182, 1998.

MISHRA, S.; AHMAD, S.; KUMAR, N. et al. *Annona muricata* (the cancer killer): a review. **Glob. J. Pharm. Res.**, v. 2, p. 1613–1618, 2013.

MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxid Redox Signal.**, v. 20, n. 7, p.1126-1167, 2014.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* (Annonaceae): a review of its traditional uses, isolated acetogenins and biological activities. **International journal of molecular sciences**, v. 16, n. 7, p. 15625-15658, 2015.

MOGHADAMTOUSI, S. Z. et al. *Annona muricata* leaves accelerate wound healing in rats via involvement of Hsp70 and antioxidant defence. **International Journal of Surgery**, v. 18, p. 110–117, 2015.

MOON, J.K., SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **Journal of Agricole Food Chemistry**, v.57, p. 1655–1666, 2009.

MORTAZ, E.; ALIPOOR, S. D.; ADCOCK, I. M. et al. Update on Neutrophil Function in Severe Inflammation. **Front Immunol.**, v. 9, p. 2171, 2018.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$  in phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 71, n. 9, p. 1331–1336, 2006.

MURPHY, K; WEAVER, C. Janeway's immunobiology. **Garland Science**, 9th edn, pp 1–924, 2016.

MUSIAL, C.; KUBAN-JANKOWSKA, A.; GORSKA-PONIKOWSKA, M. Beneficial Properties of Green Tea Catechins. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1744, 2020.

NAM N. Naturally Occurring NF-kappa B Inhibitors. **Mini Rev. Med. Chem.**, v. 6, p. 945–951, 2006.

NASEF, N. A.; MEHTA, S.; FERGUSON, L. R. Susceptibility to chronic inflammation: an update. **Archives of Toxicology**, v. 91, n. 3, p.1131–1141. 2017.

OHKAWA, H.; OHISHI, N.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, n. 2, Pages 351-358, 1979.

OLSZOWY, M. What is responsible for antioxidant properties of polyphenolic compounds from plants?. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 144, p. 135-143, 2019.

OSAWA, T. Development and application of oxidative stress biomarkers. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 564–572, 2017.

PADMA, P.; CHANSAURIA, J.; KHOSA, R. et al. Effect of *Annona muricata* and *Polyalthia cerasoides* on brain neurotransmitters and enzyme monoamine oxidase following cold immobilization stress. **J. Nat. Rem.**, v.1, p.144–146, 2001

PAN, M. H; LAI, C. S; WU, J. C; HO, C. T. Epigenetic and disease targets by polyphenols. **Curr Pharm Des.**, v. 19, n. 34, p. 6156-6185, 2013.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S. R. Flavonoids: an overview. **Journal of nutritional science**, v. 5, p. e47, 2016.

PHANIENDRA, A.; JESTADI, D. B.; PERIYASAMY, L. Free radicals: properties, sources, targets, and their implication in various diseases. **Indian J Clin Biochem.**, v. 30, n. 1, p.11–26, 2015.

PIETROVSKI, E. F. et al. Topical anti-inflammatory activity of *Eugenia brasiliensis* Lam.(Myrtaceae) leaves. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 60, n. 4, p. 479-487, 2008.

POMA, E. M.; REQUIS, E. R.; GORDILLO, G. C.; FUERTES, C. M. Estudio fitoquímico y actividad antiinflamatoria de la *Annona muricata* L. (guanábana) de Cuzco. **Cienc E Investig.**, v. 14, p. 29–33, 2011.

PORTH, C. M.; MATFIN, G. Fisiopatologia. [tradução Carlos Henrique de Araújo Cosendey, Maiza Ritomy Ide, Mariângela Vidal Sampaio Fernandes e Sylvia Werdmüller von Elgg Roberto]. 9ª ed. Rio de Janeiro, **Guanabara Koogan**, 2016.

PRYOR, W. A.; HOUK, K. N.; FOOTE, C. S. et al. Free radical biology and medicine: it's a gas, man! **American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 291, n. 3, p. R491-R511, 2006.

PULIDO, R.; BRAVO, L.; SAURA-CALIXTO, F. Antioxidant activity of dietary as determined by a modified ferric reducing/ antioxidant power assay. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v. 48, p. 3396-3402, 2000.

QUILEZ, A. et al. Validation of ethnopharmacological use as anti-inflammatory of a decoction from *Annona muricata* leaves. **Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.**, v. 12, p. 14–20, 2015.

QUIÑONES, M.; MIGUEL, M.; ALEIXANDRE, A. Beneficial effects of polyphenols on cardiovascular disease. **Pharmacol Res.**, v. 68, n. 1, p. 125-131, 2013.

RADY, I; BLOCH, M. B; CHAMCHEU, R. N. et al. Anticancer Properties of Graviola (*Annona muricata*): A Comprehensive Mechanistic Review. **Oxid Med Cell Longev.** V. 2018, p. 1826170, 2018.

- RANKIN, J. A. Biological Mediators of Acute Inflammation. **AACN Clinical Issues: Advanced Practice in Acute and Critical Care**, v. 15, n. 1, p. 3–17, 2004.
- RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S. et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflamm Allergy Drug Targets**. v. 8, n. 3, p. 229–235, 2009.
- REUTER, S; GUPTA, S. C; CHATURVEDI, M. M; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked?. **Free Radic Biol Med.**, v. 49, n. 11, p. 1603-1616, 2013.
- RIBEIRO, R.A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2011.
- ROCHA, E; SILVA, M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**, v. 8, n. 1-2, p. 45-49, 1978.
- ROSLIDA, A. H; TAY, C. E; ZURAINI, A; CHAN P. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the ethanolic extract of *Annona muricata* leaf. **J Nat Remedies**, v. 10, p. 97-104, 2010.
- SAMIEC, P. S; DREWS-BOTSCH, C; FLAGG, E. W. et al. Glutathione in human plasma: decline in association with aging, age-related macular degeneration, and diabetes. **Free Radic Biol Med.**, v. 24, n. 5, p. 699-704, 1998.
- SCALBERT, A; WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols, **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 8, p. 2073S–2085S, 2000.
- SEARS, B; RICORDI, C. Role of fatty acids and polyphenols in inflammatory gene transcription and their impact on obesity, metabolic syndrome and diabetes. **Eur Rev Med Pharmacol Sci**. v. 16, n.9, p. 1137-115, 2012.
- SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. **Annu Rev Immunol**. V. 25, p. 101-137, 2007.
- SIES, H. Oxidative stress: from basic research to clinical application. **Am J Med**. v. 91, n. 3C, p. 31S-38S, 1991.
- SILVA, L. M. R. D; LIMA, J. D. S. S; MAGALHÃES, F. E. A. et al. Graviola Fruit Bar Added Acerola By-Product Extract Protects Against Inflammation and Nociception in Adult Zebrafish (*Danio rerio*). **J Med Food.**, v. 23, n. 2, p. 173-180, 2020.
- SOSA, S; PACE, R; BORNANCIN, A. et al. Topical anti-inflammatory activity of extracts and compounds from *Hypericum perforatum* L. **J Pharm Pharmacol**. V. 59, n. 5, p. 703-709, 2007.
- STRZEPA, A.; PRITCHARD, K. A.; DITTEL, B. N. Myeloperoxidase: A new player in autoimmunity. **Cellular immunology**, v. 317, p. 1–8, 2017.

SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolic constituents of *Prunus domestica* L.- The quantitative analysis of phenolic constituents. **Journal of Science and Food Agriculture**, v. 10, p. 63-68, 1959.

TAKEUCHI, Y; NISHIKAWA, H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. **International Immunology**, v.28, n. 8, p. 401–409, 2016.

TERAO, J. Dietary flavonoids as antioxidants. **Forum Nutr.**, v. 61, p. 87-94, 2009.

TIZARD, I. R. Imunidade inata: inflamação. In: TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. 6. ed. São Paulo: Roca, 2002. p. 39-50.

TOKARZ, P.; KAARNIRANTA, K.; BLASIAK, J. Role of antioxidant enzymes and small molecular weight antioxidants in the pathogenesis of age-related macular degeneration (AMD). **Biogerontology**, v. 14, n. 5, p. 461–482, 2013.

TORRES, M. P. et al. Graviola: a novel promising natural-derived drug that inhibits tumorigenicity and metastasis of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo through altering cell metabolism. **Cancer letters**, v. 323, n. 1, p. 29-40, 2012.

TORRES-RÊGO, M; FURTADO, A. A; BITENCOURT, M. A. et al. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae). **BMC Complement Altern Med.**, V. 16, p. 275, 2016.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 853-859, 2002.

TRESSERRA-RIMBAU, R. M.; LAMUELA-RAVENTOS, J. J.; MORENO. Polyphenols, food and pharma. Current knowledge and directions for future research. **Biochemical Pharmacology**, 2018.

TUNGMUNNITHUM, D.; THONGBOONYOU, A.; PHOLBOON, A. et al. Flavonoids and Other Phenolic Compounds from Medicinal Plants for Pharmaceutical and Medical Aspects: An Overview. **Medicines (Basel)**, v. 5, n. 3, p. 93, 2018.

VACA, C. E.; WILHELM, J.; HARMS-RINGDAHL, M. Interaction of lipid peroxidation products with DNA. A review. **Mutation Research**, v. 195, n. 2, p. 137–149, 1988.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 1, p. 44–84, 2007.

VARELA, M. L.; MOGILDEA, M.; MORENO, I.; LOPES, A. Acute inflammation and metabolism. **Inflammation**, v. 41, v. 4, p. 1115-1127, 2018.

VEAL, E.; JACKSON, T.; LATIMER, H. (2018). Role/s of “Antioxidant” Enzymes in Ageing. **Biochemistry and Cell Biology of Ageing: Part I Biomedical Science**, p. 425–450, 2018.

WAHAB, S. M.; JANTAN, I.; HAQUE, M. A.; ARSHAD, L. Exploring the Leaves of *Annona muricata* L. as a Source of Potential Anti-inflammatory and Anticancer Agents. **Front Pharmacol.**, v. 9, p. 661, 2018.

WARD, P. A.; GILROY, D. W. (Ed.). **Fundamentos da inflamação**. Cambridge University Press, 2010.

XU, D.; HU, M. J.; WANG, Y. Q.; CUI, Y. L. Antioxidant activities of quercetin and its complexes for medicinal application. **Molecules**, v. 24, n. 6, p. 1123, 2019.

YAHFOUFI, N.; ALSADI, N.; JAMBI, M. et al. The Immunomodulatory and Anti-Inflammatory Role of Polyphenols. **Nutrients**, v. 10, n. 11, p. 1618, 2018.

YAN, F.; MU, Y.; YAN, G. et al. Antioxidant Enzyme Mimics with Synergism. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.10, n. 4, p. 342–356, 2010.

YANG, C. et al. Synergistic interactions among flavonoids and acetogenins in Graviola (*Annona muricata*) leaves confer protection against prostate cancer. **Carcinogenesis**, v. 36, n. 6, p. 656-665, 2015.

YASUKAWA, K. et al. Effect of chemical constituents from plants on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 37, n. 4, p. 1071–1073, 1989.

YOUNG, J. M.; WAGNER, B. M.; SPIRES, D. A. Tachyphylaxis in 12-0-tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 80, n. 1, p. 48–52, jan. 1983.

ZAKARYAN, H.; ARABYAN, E.; ZANDI, K. Flavonoids: promising natural compounds against viral infections. **Archives of virology**, v. 162, n. 9, pp.2539-2551, 2017.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZUO, L. et al. Inflammaging and oxidative stress in human diseases: From molecular mechanisms to novel treatments. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 18, p. 4472, 2019.

## **APÊNDICE – Lista de produções bibliográficas durante o período da pós-graduação**

1. CERCATO, L. M. et al. A systematic review of medicinal plants used for weight loss in Brazil: is there potential for obesity treatment?. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 176, p. 286-296, 2015.
2. CERCATO, L. M. et al. Administration of the aqueous extract of the stem bark of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae) does not alter obesity induced by high-fat diet in mice. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 10, n. 12, p. 158-166, 2016.
3. WHITE, P. A. S. et al. Aqueous extract of *Chrysobalanus icaco* leaves, in lower doses, prevent fat gain in obese high-fat fed mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 179, p. 92-100, 2016.
4. WHITE, P. A. S. et al. *Chrysobalanus icaco* L. leaves normalizes insulin sensitivity and blood glucose and inhibits weight gain in high-fat diet-induced obese mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 2, p. 155-160, 2016.
5. DE ALMEIDA BARROS, N. et al. Comparison of Traditional strength training and Kaatsu strength training on thermal asymmetry, fatigue rate, and peak torque. **Journal of Exercise Physiology Online**, v. 20, n. 1, p. 1-13, 2017.
6. OLIVEIRA, A. S. et al. The ethanol extract of *Leonurus sibiricus* L. induces antioxidant, antinociceptive and topical anti-inflammatory effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 206, p. 144-151, 2017.
7. SANTANA, M. T. et al. Medicinal plants in the treatment of colitis: evidence from preclinical studies. **Planta Medica**, v. 83, n. 07, p. 588-614, 2017.
8. DE SOUZA, R. F. et al. Effect of ibuprofen on muscle, hematological and renal function, hydric balance, pain, and performance during intense long-distance running. **The Journal of Strength & Conditioning Research**, v. 34, n. 7, p. 2076-2083, 2020.
9. OLIVEIRA, J. P. et al. The effect of natural products in animal models of temporomandibular disorders. **Journal of Applied Oral Science**, v. 28, 2020.
10. OLIVEIRA, J. P. et al. Natural products for orofacial nociception in pre-clinical studies: A systematic review. **Archives of Oral Biology**, p. 104748, 2020.
11. CERCATO, L. M. et al. Reduced cutaneous inflammation associated with antioxidant action after topical application of the aqueous extract of *Annona muricata* leaves. **Inflammopharmacology**, p. 1-9, 2020.

12. CERCATO, L. M. et al. Effect of flavonoids in preclinical models of experimental obesity. Submetido a **Pharmanutrition** em 13/01/2021.

## ANEXO A – Artigo publicado referente aos experimentos da Tese

Inflammopharmacology  
<https://doi.org/10.1007/s10787-020-00735-1>

Inflammopharmacology

ORIGINAL ARTICLE



## Reduced cutaneous inflammation associated with antioxidant action after topical application of the aqueous extract of *Annona muricata* leaves

Luana M. Cercato<sup>1</sup> · Jéssica M. D. Araújo<sup>2</sup> · Alan S. Oliveira<sup>1</sup> · Allan J. O. Melo<sup>3</sup> · Bruno S. Lima<sup>3</sup> · Edmilson W. P. dos Santos<sup>2</sup> · Agenor G. dos S. Neto<sup>4</sup> · Ricardo L. C. de Albuquerque-Júnior<sup>4</sup> · Marcelo C. Duarte<sup>3</sup> · Adriano A. S. Araujo<sup>1,3</sup> · Ana Mara O. Silva<sup>1</sup> · Renata Grespan<sup>2</sup> · Cristiane B. Correa<sup>1,2</sup> · Enilton A. Camargo<sup>1,2</sup>

Received: 15 April 2020 / Accepted: 18 June 2020  
 © Springer Nature Switzerland AG 2020

### Abstract

*Annona muricata* L. is used in folk medicine for treatment of diseases related to inflammatory and oxidative processes. This study investigated the effect of the aqueous extract of *A. muricata* leaves (AEAM) on TPA-induced ear inflammation and antioxidant capacity, both in vitro and in vivo. The in vitro antioxidant capacity of AEAM was measured by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), ferric reducing/antioxidant power (FRAP) and lipoperoxidation assays. Cytotoxicity and reactive oxygen species (ROS) release were evaluated in the L929 fibroblasts. Swiss mice were submitted to TPA application and were topically treated with AEAM (0.3, 1 or 3 mg/ear). After 6 h, inflammatory and oxidative parameters were evaluated. Quercetin 3-glucoside, rutin, chlorogenic acid, catechin and gallic acid were identified in AEAM. It also presented antioxidant activity in all in vitro assays used. Incubation with AEAM did not cause cell cytotoxicity but reduced ROS release from fibroblasts. Compared with the control group, treatment with AEAM significantly reduced ear oedema and mieloperoxidase activity in inflamed ears, as well as histological parameters of inflammation. These results were associated with the reduction of total hydroperoxides and modulation of catalase, but not superoxide dismutase activity. These findings show the anti-inflammatory effect of AEAM is associated with antioxidant capacity.

**Keywords** *Annona muricata* · Skin inflammation · Phenolic compounds · Oxidative stress · Medicinal plant

### Introduction

*Annona muricata* L. (Annonaceae) is known as soursop or graviola and has been used in folk medicine for the treatment of many pathological processes. This plant species is widely found in tropical and subtropical regions, including

Central and South America, Western Africa and Southeast Asia (Wahab et al. 2018). Parts of *A. muricata*, including, fruits, seeds, roots and leaves, are traditionally used as anti-parasite, anti-hypertensive, analgesic, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-cancer agents (Gavamukulya et al. 2017; Wahab et al. 2018).

Some pre-clinical studies have confirmed the anti-inflammatory action of extracts prepared from the leaves of *A. muricata*. The pre-treatment with the ethanol extract of leaves reduced carrageenan-induced paw oedema in rats, which was associated with cyclooxygenase inhibition (Poma et al. 2011). Another study associated the anti-inflammatory effect of the leaf extract with the decrease of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , besides modulation of NO release (Kim et al. 2016). The aqueous extract of *A. muricata* leaves had anti-inflammatory effects on 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced ear oedema and carrageenan-induced paw oedema in mice (Quilez et al. 2015).

✉ Enilton A. Camargo  
 enilton.camargo@pq.cnpq.br

<sup>1</sup> Graduate Programme in Health Sciences, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

<sup>2</sup> Graduate Programme in Physiological Sciences, Department of Physiology, Federal University of Sergipe (UFS), Marechal Rondon Av, São Cristóvão, SE 49100-000, Brazil

<sup>3</sup> Department of Pharmacy, Federal University of Sergipe, São Cristóvão, SE, Brazil

<sup>4</sup> Research and Technology Institute (ITP), Tiradentes University, Aracaju, SE, Brazil

Published online: 09 July 2020

Ativar o Windows  
 Acesse Configurações

## ANEXO B – Certificado da Comissão de Ética no Uso de Animais



Comissão de Ética no  
Uso de Animais

### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito do extrato aquoso das folhas de *Annona muricata* em modelos de inflamação cutânea", protocolada sob o CEUA nº 9256010719 (ID 000167), sob a responsabilidade de **Enilton Aparecido Camargo e equipe; Luana Mendonça Cercato** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Sergipe (CEUA/UFS) na reunião de 05/02/2020.

We certify that the proposal "Evaluation of the aqueous extract from leaves of *Annona muricata* in models of cutaneous inflammation", utilizing 295 Heterogenics mice (295 males), protocol number CEUA 9256010719 (ID 000167), under the responsibility of **Enilton Aparecido Camargo and team; Luana Mendonça Cercato** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Sergipe (CEUA/UFS) in the meeting of 02/05/2020.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa \(Acadêmica\)](#)

Vigência da Proposta: de [10/2019](#) a [07/2021](#) Área: [Farmacologia](#)

Origem: [Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [6 a 8 semanas](#) N: [295](#)

Linhagem: [Swiss](#) Peso: [25 a 35 g](#)

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia do Processo Inflamatório

Ativar o Windows  
Acesse Configurações para ativar o Win  
São Cristóvão, 05 de fevereiro de 2020

Prof. Dr. Josemar Sena Batista  
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Sergipe

Prof. Dr. Anderson Carlos Marçal  
Vice-Cordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Universidade Federal de Sergipe

## ANEXO C – Comprovante de cadastro de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado



Ministério do Meio Ambiente  
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A543CB5

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A543CB5**  
 Usuário: **Universidade Federal de Sergipe**  
 CPF/CNPJ: **13.031.547/0001-04**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
 Finalidade do Acesso:  
 Pesquisa Científica     Bioprospecção     Desenvolvimento Tecnológico

### Espécie

**Caesalpinia pyramidalis**  
**Leonurus sibiricus**  
**Vaccinium macrocarpon**  
**Hancornia speciosa**  
**Annona muricata**  
**Entrecasca da C. pyramidalis**  
**Partes aéreas da L. sibiricus.**  
**Extrato seco dos frutos (comercial)**

### Fonte do CTA

**CTA de origem não identificável**  
**CTA de origem não identificável**  
**CTA de origem não identificável**

Data do Cadastro: **30/10/2018 12:40:35**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**



Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **15:52** de **01/11/2018**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **SISGEN**