



UNIVERSIDADE FEDERAL DO DELTA DO PARNAÍBA – UFDPAr
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA

ANTÔNIO KLEITON DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO DITERPENÓ ANNONALIDA
ORIUNDO DA *Casimirella ampla* (Miers) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO GERAL**

PARNAÍBA

2022

ANTÔNIO KLEITON DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO DITERPENO ANNONALIDA
ORIUNDO DA *Casimirella ampla* (Miers) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO GERAL**

Trabalho de conclusão do curso de Bacharelado em Biomedicina, da Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr, em cumprimento à exigência para obtenção do título de bacharel em Biomedicina.

Linha de pesquisa: Farmacologia.

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

Coorientador: Dr. Tarcisio Vieira de Brito

PARNAÍBA

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Delta do
Parnaíba Biblioteca Central Prof.
Cândido Athayde Serviço de
Processamento Técnico

S725a Sousa, Antônio Kleiton de.

Avaliação do efeito anti-inflamatório do Diterpeno Annonalida oriundo da *Casimirella ampla* (Miers) em modelos experimentais de inflamação geral. [recurso eletrônico] / Antônio Kleiton de Sousa – 2022.

1 Arquivo em PDF.

TCC (Bacharelado em Biomedicina) – Universidade Federal do Delta do Parnaíba, 2022.

Orientação: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

1. Antioxidante. 2. Diterpeno. 3. Inflamação. 4. Plantas medicinais.
I. Título.

CDD: 615.89

ANTÔNIO KLEITON DE SOUSA

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO DITERPENO ANNONALIDA
ORIUNDO DA *Casimirella ampla* (Miers) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
INFLAMAÇÃO GERAL**

Aprovado em: 11/05/2022

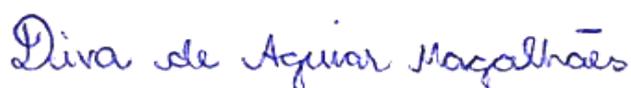
BANCA EXAMINADORA



Dr. André Luiz dos Reis Barbosa
Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr
(Orientador)



Dr. Tarcisio Vieira de Brito
Universidade Federal do Piauí – UFPI
(Coorientador)



Dra. Diva de Aguiar Magalhães
Universidade Federal do Delta do Parnaíba – UFDPAr

PARNAÍBA

2022

Dedico,

Primeiramente a Deus,

A minha mãe e meus familiares por toda força e amor.

Aos meus amigos, pelo apoio emocional.

A Eloiza Muniz pela paciência e incentivo.

e Luzia de Sousa (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela vida, saúde, por clarear minha mente em momentos difíceis, por me dar condições e força para me manter firme nos meus objetivos, por me dar disposição para a realização deste trabalho.

À minha família pela educação, princípios, pelo apoio, conselhos e incentivo imenso que me fizeram ir tão longe, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui, em especial minha mãe Antônia Risomar de Sousa que é o motivo de minha perseverança e Maria Senhora de Sousa pelo carinho, amor, ensinamentos e conselhos, pois sem vocês, nada disso seria possível. Meus maiores exemplos e maiores admirações, a vocês todo o meu amor.

Aos meus irmãos, Klecyanne Kyelle de Sousa, Kleber Henrique de Sousa e Kauane Jamilli de Sousa Oliveira, pelo apoio e acreditarem na minha capacidade. Agradeço ainda, por cada ensinamento, momentos compartilhados e ajuda, vocês são meu alicerce, obrigado por tudo!

À Luzia de Sousa (*in memorian*) e Aparecida de Sousa pelo incentivo, conselhos, apoio financeiro e por ter acreditado que eu seria capaz de chegar até aqui.

À minha namorada, Eloiza Alves Muniz Costa pelo carinho, motivação, paciência, apoio, companheirismo, atenção, por dar bons conselhos e por estar do meu lado em vários momentos, sendo muito importante na minha caminhada acadêmica, me incentivando, descontraindo, passando boas energias e se alegrando com minhas conquistas. Você foi essencial!

Às minhas amigas da graduação, Ana Beatriz Nunes de Carvalho, Iasmym Maria Costa do Nascimento e Lara Meneses Alves, pela companhia e parceria durante o dia a dia, estudos e momentos de descontração, agradeço pela amizade de vocês que foi muito importante, desejo toda felicidade e sucesso para trilharem caminhos ainda maiores.

Ao meu amigo de longa data, Salvador Ferreira de Andrade Filho, por sua amizade, conselhos e por toda parceria que apesar da distância esteve sempre comigo dando seu apoio e ajudando da forma que pôde. Desejo todo sucesso e tudo de melhor na sua vida.

Ao meu orientador Dr. André Luís dos Reis Barbosa pela paciência, incentivo, ensinamentos e conselhos que me fizeram crescer intelectualmente e desenvolver habilidades que acrescentaram muito na minha vida acadêmica.

Aos membros do Laboratório de Fisi-Farmacologia Experimental (LAFEX), pelo acompanhamento, auxílio, apoio técnico e científico, especialmente ao Dr. Tarcísio Vieira de Brito, a Dra. Diva de Aguiar Magalhães e Stefany Guimarães Sousa pelo conhecimento adquirido, pela paciência e por ter acrescentado muito no meu crescimento profissional e pessoal.

À Universidade Federal do Delta do Parnaíba (UFDP), pelo apoio Estudantil, estrutura e por me proporcionar grandes ensinamentos e poder aplicar meus conhecimentos.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuiu para o meu desenvolvimento e para a realização deste estudo. Muito obrigado!

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar ao contrário”

- Albert Einstein

RESUMO

A Inflamação é uma resposta fundamental de proteção primária do organismo contra lesões ou invasão de patógenos. A resposta inflamatória é iniciada por uma infinidade de estímulos endógenos e exógenos com sintomas característicos. Os compostos isolados de plantas com atividade anti-inflamatória têm sido fontes terapêuticas alternativas, que substituem muitos medicamentos com efeitos colaterais insatisfatório. Uma fonte interessante de produtos naturais para tratar diversas condições patológicas são as plantas medicinais, dentre elas está a *Casimirella ampla* (*C. ampla*) que possui poucos estudos investigando seus efeitos terapêuticos, porém em suas raízes possuem compostos diterpenoides que são investigados quanto ao seu envolvimento durante a resposta inflamatória, sendo assim uma promissora fonte de moléculas. O presente estudo tem como objetivo avaliar o possível efeito anti-inflamatório do diterpenoannonalida (An) extraído da *C. ampla* em modelos de inflamação geral em camundongos. A atividade anti-inflamatória do composto An foi investigada por meio de modelos animais, no qual tiveram uso aprovado na comissão de ética no uso de animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí – UFPI sob o número 020/19. Os protocolos experimentais seguiram as normas e diretrizes do Colégio Brasileiro de Experimentação animal (COBEA). Foram utilizados camundongos Swiss pesando ente 25-30g, sendo 6 animais por grupo. Para a avaliação anti-inflamatória, os animais foram pré-tratados com An nas doses de 0,1; 1,0 ou 10 mg/kg via oral (v.o.) e posteriormente submetidos a um edema de pata induzido por carragenina (Cg) 500 µg por pata afim de avaliar uma possível participação anti-inflamatória desse composto e para fazer a triagem com finalidade de escolher uma melhor dose com efeito anti-inflamatório que seria usada nos demais testes, Foi utilizado ainda um grupo que recebeu uma solução fisiológica de salina 0,9% e um grupo com fármaco de referência indometacina (Indo) 10 mg/kg. Após o edema de Cg os segmentos da região suplantar das patas dos animais foram retirados e utilizados para a avaliação histopatológica e da enzima mieloperoxidase (MPO). Os animais passaram ainda por edema de pata pelos mediadores vasoativos histamina (100 µg/pata) e serotonina (100 µg/pata), foi induzido também peritonite com uma injeção de 250 µg de Cg intraperitoneal (i.p.) nos camundongos e o líquido peritoneal foi avaliado quanto a migração de leucócitos e níveis de glutathiona (GSH). Os animais tratados com An 0,1 mg/kg apresentaram resultados pertinentes e estatisticamente significativos na redução do edema causado por Cg, assim como na resposta vascular pela diminuição dos edemas vasculares causados por histamina e serotonina. Ademais, o referido composto apresentou eficácia na redução das lesões microscópicas do tecido da pata, níveis da enzima MPO e migração de células para a cavidade peritoneal, bem como no aumento de níveis de GSH. Os resultados obtidos permitem inferir que o composto derivado da *C. ampla* An na dose de 0,1 mg/kg possui efeito anti-inflamatório e atenua o estresse oxidativo revelando um potencial farmacológico do composto como um promissor agente anti-inflamatório.

Palavras-chave: Antioxidante. Diterpeno. Inflamação. Plantas medicinais.

ABSTRACT

Inflammation is a fundamental response of primary protection of the organism against injury or invasion of pathogens. The inflammatory response is initiated by a multitude of endogenous and exogenous stimuli with characteristic symptoms. The compounds isolated from plants with anti-inflammatory activity have been alternative therapeutic sources, which replace many drugs with unsatisfactory side effects. An interesting source of natural products to treat various pathological conditions are medicinal plants, among them is *Casimirella ampla* (*C. ampla*) which has few studies investigating its therapeutic effects, but in its roots they have diterpenoid compounds that are investigated for their involvement. during the inflammatory response, thus being a promising source of molecules. The present study aims to evaluate the possible anti-inflammatory effect of diterpene annonalide (An) extracted from *C. ampla* in mouse models of general inflammation. The anti-inflammatory activity of compound An was investigated using animal models, in which their use was approved by the Committee on Ethics in Animal Use (CEUA) of the Federal University of Piauí - UFPI under number 020/19. The experimental protocols followed the norms and guidelines of the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA). Swiss mice weighing between 25-30g were used, with 6 animals per group. For the anti-inflammatory evaluation, the animals were pre-treated with An at doses of 0.1; 1.0 or 10 mg/kg orally (v.o.) and subsequently submitted to a paw edema induced by carrageenan (Cg) 500 µg per paw in order to evaluate a possible anti-inflammatory participation of this compound and to perform the screening with the purpose of choose a better dose with anti-inflammatory effect that would be used in the other tests. A group that received a physiological saline solution 0.9% and a group with the reference drug indomethacin (Indo) 10 mg/kg were also used. After Cg edema, the segments of the supplant region of the animals' paws were removed and used for histopathological and myeloperoxidase (MPO) enzyme evaluation. The animals also underwent paw edema by the vasoactive mediators histamine (100 µg/paw) and serotonin (100 µg/paw), peritonitis was also induced with an injection of 250 µg of Cg intraperitoneal (i.p.) in the mice and the peritoneal fluid was evaluated for leukocyte migration and glutathione (GSH) levels. The animals treated with An 0.1 mg/kg showed relevant and statistically significant results in the reduction of edema caused by Cg, as well as in the vascular response due to the reduction of vascular edema caused by histamine and serotonin. Furthermore, said compound was effective in reducing microscopic lesions of the paw tissue, MPO enzyme levels and cell migration to the peritoneal cavity, as well as increasing GSH levels. The results obtained allow us to infer that the compound derived from *C. ampla* An at a dose of 0.1 mg/kg has an anti-inflammatory effect and attenuates oxidative stress, revealing a pharmacological potential of the compound as a promising anti-inflammatory agent.

Keywords: Antioxidant. Diterpene. Inflammation. Medicinal plants.

LISTA DE ABREVEATURAS

5-HT	Serotonina
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
An	Annonalida
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agencia nacional de vigilância sanitária
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
<i>C. ampla</i>	<i>Casimirella ampla</i>
CEUA	Comitê de ética no uso de animais
Cg	Carragenina
Cl	Íons cloro
ClO	Hipoclorito
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX -1	Ciclo-oxigenase 1
COX -2	Ciclo-oxigenase 2
COX-3	Ciclo-oxigenase 3
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DTNB	Ácido ditio-nitrobenzoico
EPM	Erro Padrão da Média
EROS	Espécies reativas de oxigênio
FPP	Fasnesil pirofosfato
GGPP	Geranilgeranil pirofosfato
GPP	Geranil pirofosfato
GSH	Glutationa
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HE	Hematoxilina e eosina
HIST	Histamina
HTAB	Brometo de hexa-decil-trimetil-amônio
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
ICAM-1	Molécula de adesão da célula intercelular-1

IL	Interleucina
Indo	Indometacina
IPP	Isopentenil difosfato
IRA	Insuficiência renal aguda
IRC	Insuficiência renal aguda
M	Mol
min	Minutos
mL	Mililitros
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida
nm	Nanômetros
NPSH	Grupos sulfidrílicos não-proteicos
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Solução salina tamponada com fosfato de heparina
pH	Potencial hidrogeniônico
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões
rpm	Rotações por minuto
Sal	Solução salina
SISGEN	Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
TCA	Ácido tricloroacético
TGI	Trato Gastro Intestinal
TNF-α	Fator de necrose tumoral - α
Tw	Tween
V.o.	Via oral
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
μg	Microgramas
μL	Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio	22
Figura 2.	Raiz tuberosa da <i>Casimirella ampla</i>	27
Figura 3.	Representação estrutural da annonalida (15-oxo-16-ol, 3 β ,20-epóxi-3 α -hidroxi-9-epi-7-pimarano-19,6 β -olida)	28
Figura 4.	Efeito do diterpeno annonalida sobre o edema de pata induzido por carragenina	36
Figura 5.	Microfotografia (50 μ m) retratando o efeito da annonalida sobre os danos microscópicos de lesão provocado pelo edema de pata induzido por Cg	38
Figura 6.	Efeito da annonalida no escore de Edema/inchaço na avaliação histopatológica da pata	39
Figura 7.	Efeito da Annonalida no escore de infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica da pata	39
Figura 8.	Efeito da annonalida no escore de densidade da derme na avaliação histopatológica da pata	40
Figura 9.	Efeito da annonalida sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata	41
Figura 10.	Ação da annonalida sobre o edema de pata induzido por histamina	43
Figura 11.	Ação da annonalida frente ao edema de pata induzido por Serotonina	44
Figura 12.	Efeito da annonalida na Contagem total de células durante a peritonite induzida por carragenina	46
Figura 13.	Ação da annonalida sobre os níveis de glutaciona no exsudato peritoneal	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Avaliação dos escores de infiltração de células inflamatórias para os tecidos da pata	32
Tabela 2.	Avaliação dos escores microscópios de edema/inchaço nos tecidos da pata	32
Tabela 3.	Avaliação dos escores microscópios de lesão quanto a densidade da derme	33

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Inflamação	19
2.2	Mecanismos e células envolvidas na resposta inflamatória	20
2.3	Terapia e efeitos colaterais decorrentes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs	23
2.4	A espécie <i>Casimirella ampla</i> como fonte de moléculas bioativas	26
3.	OBJETIVOS	29
3.1	Objetivo geral	29
3.2	Objetivos específicos	29
4.	METODOLOGIA	30
4.1	Coleta do material e extração da annonalida da <i>Casimirella ampla</i>	30
4.2	Animais Experimentais	30
4.3	Questões éticas	30
4.4	Métodos experimentais utilizados nos ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório	31
4.4.1	Edema de pata induzido por carragenina	31
4.4.2	Avaliação histopatológica	31
4.4.3	Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios	33
4.4.4	Determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina	33
4.4.5	Atividade da enzima mieloperoxidase	34
4.4.6	Análises das concentrações de Glutathione	34
4.4.7	Análise estatística	35
5.	RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1	Efeito da Annonalida sobre o edema de pata induzido por carragenina...	35
5.2	Efeito da Annonalida sobre os critérios microscópicos de lesão do tecido da pata no edema induzido por Carragenina	37
5.3	Efeito da Annonalida sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata	41
5.4	Ação da Annonalida sobre o edema de pata induzido por Histamina	42

5.5	Ação da Annonalida sobre o edema de pata induzido por Serotonina	44
5.6	Efeito da Annonalida na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina	45
5.7	Ação da Annonalida sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal	47
6.	CONCLUSÃO	48
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
	ANEXO I. Declaração de acesso Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)	60
	ANEXO II. Carta de aprovação no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA)	61

1. INTRODUÇÃO

A Inflamação é uma resposta fundamental de proteção primária do organismo contra lesões ou invasão de patógenos (ALMEIDA *et al.*, 2017). A resposta inflamatória é iniciada por uma infinidade de estímulos endógenos e exógenos que podem acabar levando ao desenvolvimento agudo ou crônico com sintomas característicos, que incluem dor, calor, rubor, edema e perda da funcionalidade (WINAND; SESTER; NETT, 2021) que resultam da resposta local de células imunes, vascular e parenquimatosa durante a lesão tecidual (TABAS; GLASS, 2013). Essa resposta envolve interações complexas de mediadores solúveis, moléculas da matriz extracelular, células residente e células infiltrantes (TASNEEM *et al.*, 2019).

Um número considerável de medicamentos analgésicos está atualmente disponível com a finalidade de tratamento da inflamação e da dor. A terapia medicamentosa para tratar a inflamação e seus sinais na sua grande maioria é baseada em anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) que são eficazes para uma ampla gama de condições que envolvem a inflamação (ALMEIDA *et al.*, 2017). No entanto, seu uso é limitado devido aos seus efeitos colaterais relacionados, incluindo toxicidades gastrointestinais, lesões renais, hepatotoxicidade (BINDU; MAZUMDER; BANDYOPADHYAY, 2020), vômito após o tratamento com opioides, e graves efeitos cardiovasculares associados ao uso prolongado de anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) (OKUSADA *et al.*, 2011).

Os compostos isolados de plantas com atividade anti-inflamatória têm sido fontes terapêuticas alternativas, que substituem muitos medicamentos com efeitos colaterais insatisfatório. Assim as plantas são constantemente examinadas com relação a seu potencial anti-inflamatório (STANKOVIC *et al.*, 2016). As plantas medicinais são uma fonte interessante de produtos naturais para tratar diversas condições patológicas. Os agentes terapêuticos e as aplicações de novos compostos vêm aumentando de forma gradual nos últimos anos (SHAZHNI; RENU; VIJAYARAGHAVAN, 2018; NUNES *et al.*, 2020).

As plantas produzem diversos compostos com atividades terapêuticas, essas pequenas moléculas orgânicas (VIRSHETTE; PATIL; SOMKUWAR, 2019; NUNES *et al.*, 2020) representam uma fonte para o desenvolvimento de medicamentos (YILMAZER *et al.*, 2016; BATISTA *et al.*, 2020) que continuam fornecendo novos meio

terapêuticos para a indústria farmacêutica. Produtos naturais ou derivados de plantas representam mais de 50% de todos medicamentos em uso clínico no mundo (BATISTA *et al.*, 2020).

A literatura abrange um número significativo de compostos com atividades biológicas isoladas de diferentes espécies de plantas, que incluem ervas, especiarias e plantas medicinais. Dentre esses compostos as classes que se destacam são os polifenóis (VÁZQUEZ-FRESNO *et al.*, 2019) alcaloides (PYNE; NARCROSS, 2019; NUNES *et al.*, 2020), fenilpropanóides (SÁ *et al.*, 2014) e terpenos por possuírem atividade anti-inflamatória (NUNES *et al.*, 2020).

Os terpenos (isoprenos) são compostos formados de combinações de várias unidades de 5 carbonos, contemplam uma variedade de classes de metabólitos secundários de fórmula química $(C_5H_8)_n$. Modificações enzimáticas subsequentes por reações redoxes atribuem propriedades funcionais diferentes a várias terpenos (RUBIO *et al.*, 2013). Entre os terpenos, destaca os diterpenos na qual é um dos constituintes principais da *C. ampla* (anteriormente *Humirianthera ampla*) (LUIZ *et al.*, 2007), por possuírem propriedades farmacológicas dos extratos vegetais com ênfase nas atividades antiofídica (STRAUCH *et al.*, 2013) antiúlcera, anti-inflamatórias e antitumorais (LUIZ *et al.*, 2007), esses compostos naturais são encontrados em várias ervas e plantas medicinais (RUBIO *et al.*, 2013). Além disso, a raiz de *C. ampla* também é utilizada por povos indígenas da região amazônica como fonte alimentícia rica em amido (RIBEIRO, 2018).

Estudos farmacológicos revelaram uma ampla gama de diterpenos com atividades anti-inflamatórias com potencial a se tornarem agentes terapêuticos eficientes. (HERAS; HORTELANO, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2015). Os interesses pela manipulação química medicinal de produtos naturais são responsáveis pela descoberta de grande maioria dos fármacos com potencial terapêuticos contra distúrbios inflamatórios. Assim, moléculas bioativas, derivadas de compostos naturais emergem como novas opções terapêuticas permitindo o desenvolvimento de alternativas farmacológicas efetivas e seguras para o tratamento de condições inflamatórias (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Desta forma, o uso de produtos naturais como os diterpenos, com potencial terapêutico tem sido bastante discutido em todo mundo. Então, sabendo da capacidade promissora dessa classe de compostos, a pesquisa com composto

isolado de *C. ampla*, são justificáveis os aprofundamentos das pesquisas que possam evidenciar ainda mais a sua possível capacidade anti-inflamatória devido principalmente à necessidade de terapias alternativas eficazes e com efeitos colaterais menos nocivos.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1. Inflamação

A inflamação é um processo fisiológico acionado sempre que um agente agressor físico, químico ou biológico, ultrapassa a barreira de defesa do corpo humano. Este processo tem como objetivo principal recompor a homeostase do tecido lesado através da ativação de diversos mediadores específicos e não específicos da imunidade (PAUL, 2013).

A inflamação caracteriza-se como uma matriz de ativação bioquímica, ativação enzimática, liberação de mediadores, extravasamento vascular, migração de células, degradação e reparo tecidual (ALMEIDA *et al.*, 2017). Diversos mediadores inflamatórios são sintetizados e secretados durante a resposta inflamatória. Durante a inflamação, células imunes como linfócitos, neutrófilos e monócitos se infiltram nos tecidos lesados (ZHANG *et al.*, 2021).

Esse processo compreende uma complexa participação de uma cascata de eventos celulares e bioquímicos nos quais estão envolvidos a ativação enzimática, extravasamento de fluídos para a matriz extracelular, liberação de mediadores inflamatórios, sensibilização e ativação de receptores, migração de células de defesa e posterior lise e reparo tecidual. A inflamação resulta na liberação de mediadores, que incluem a histamina, bradicinina e serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5HT), resultando na migração imediata de leucócitos polimorfonucleares. Os leucócitos posteriormente são fagocitados por macrófagos, contribuindo para a resolução do processo inflamatório (PAUL, 2013; BUCKLEY *et al.*, 2014).

O processo inflamatório pode ser dividido em três etapas: 1) Uma fase aguda, que caracteriza uma vasodilatação local e um aumento na permeabilidade capilar; 2) Uma fase subaguda marcada pela infiltração de leucócitos e células fagocitárias; 3) E uma fase crônica proliferativa onde ocorre a degeneração do tecido e fibrose (MURI, 2016).

Está estabelecido que os sinais clínicos da inflamação são os resultados da vasodilatação (Calor e rubor), do aumento do fluido intersticial (Tumor ou edema) e acúmulo de leucócitos e, da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (Dor) e inibição do reflexo muscular, rompimento da estrutura do tecido (Perda de Função) (ALLER, 2007; OLIVEIRA, 2014).

2.2. Mecanismos e células envolvidas na resposta inflamatória

A inflamação é uma reação complexa de defesa, que consiste em reposta nos vasos sanguíneos e o envolvimento de proteínas plasmáticas e leucócitos com intuito de neutralizar agentes causadores da lesão e promover o reparo do tecido. Esse processo baseia-se em recrutar células de defesa que estão presentes na circulação para o local da agressão, provocado pelas alterações morfofuncionais da microcirculação (GABAY, 2006).

Em um nível de sinalização, a infecção ou dano tecidual inicialmente é detectado pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) que tem finalidade de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e / ou padrões moleculares associados ao dano (DAMPs) (TABAS; GLASS, 2013).

Com a lesão tecidual no processo de inflamação, inicialmente ocorrem medidas relativamente imediatas, sucedendo respostas tais como mudanças no tônus vascular (vasoconstrição/vasodilatação) e coagulação, na tentativa de promoção da hemostasia; na sequência acontece a sinalização para ocorrer o recrutamento e a atividade subsequente de uma variedade de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios no sítio da lesão (BONECCHI; GRAHAM, 2016).

Os mediadores de defesa da resposta inflamatória abrangem os leucócitos fagócitos, anticorpos e proteínas que fazem parte do sistema complemento, essas células normalmente circulam pelo sangue, de onde podem ser rapidamente recrutadas para uma resposta imediata a inflamação. Outros mediadores são os solúveis derivados de células e precursores plasmáticos, como aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, produtos do sistema complemento, mediadores lipídicos, óxido nítrico, prostaglandinas, leucotrienos, citocinas, quimiocinas e enzimas proteolíticas (IWALEWA *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2010).

A gênese e manutenção dos sinais da inflamação envolvem a liberação de inúmeros mediadores químicos como as cininas, neuropeptídeos e histamina no local da lesão tecidual, bem como componentes do sistema complemento, citocinas e outros produtos dos leucócitos e das plaquetas (SILVA, 2015; RANG *et al.*, 2007). Vários mediadores inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, substância P, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, adenosina, ATP, prótons e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio atuam no desenvolvimento da resposta inflamatória (GODIN, 2014).

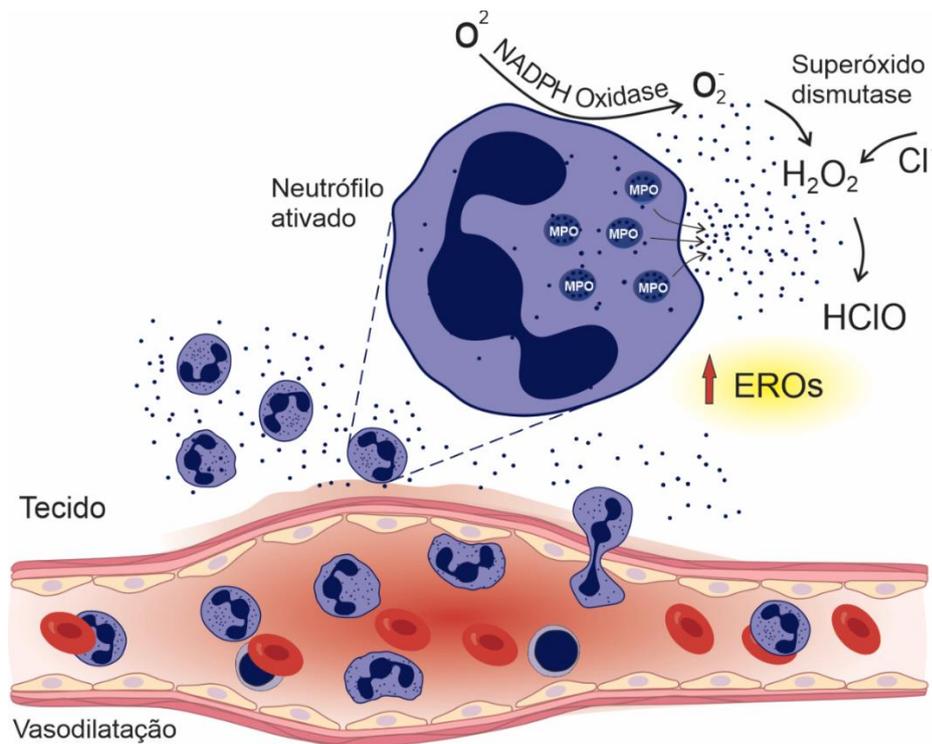
As aminas vasoativas, como histamina e serotonina, por serem mediadores pré-formados armazenados nas células, são os primeiros mediadores a serem liberados, principalmente através dos mastócitos e monócitos, promovendo vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar. Além disso, são ativados componentes do sistema de cininas, do sistema complemento e do sistema de coagulação, sendo juntamente liberadas citocinas e quimiocinas (KAWAHARA *et al.*, 2015).

A resposta local ou de fase aguda normalmente acompanhada por resposta sistêmica, essa fase ocorre com intuito de ajustar a homeostasia tissular, podendo ser fisiologia, bioquímica ou comportamental, como resposta fisiológica alterações os eventos que ocorrem são: aumento do catabolismo proteico para ocorrer o reparo tecidual, aumento da lipogênese hepática, aumento na lipólise no tecido adiposo, aumento de gliconeogênese, queda de zinco e ferro no plasma, aumento de citocinas no plasma, aumento de síntese de fatores quimiotáticos. Como fatores fisiológicos, ocorre aumento da secreção de glucagon e catecolaminas, alterações na hematopoiese, leucocitose, aumento da temperatura corporal (febre), dentre as alterações comportamentais, em decorrência dos eventos da inflamação pode haver sonolência e perda de apetite (SILVA; MACEDO, 2011).

As primeiras células que respondem o processo inflamatório são os leucócitos, especificamente neutrófilos que se deslocam para os tecidos com função de remover os elementos que estão causando a lesão liberando substâncias citoplasmáticas como proteases lisossomais. A inflamação também leva a formação de espécies reativas de oxigênio (EROs) (figura 1) como resultado da ação do ânion superóxido (O_2^-) que é convertido em H_2O_2 , pela enzima superóxido dismutase. O ânion superóxido pode ser produzido pelos neutrófilos ativados pela NADPH oxidase,

que reduz o oxigênio do meio em radical O_2^- e pela enzima MPO. Isso favorece a formação de ácido hipocloroso (HClO) a partir de H_2O_2 e íons cloro (Cl^-) produzindo que é um potente microbicida (MARTÍN *et al.*, 2004; TIDBALL, 2005).

Figura 1. Representação esquemática da formação de espécies reativas de oxigênio



Fonte: Autoria própria

A imunidade inata corresponde a primeira barreira de defesa do organismo gerada em um dano tecidual, a resposta a agressão do tecido durante a inflamação envolve vários sistemas bioquímicos. A resposta inflamatória ocorre quando o agente agressor é reconhecido pelas células e moléculas do hospedeiro, promovendo a ativação de um complexo citosólico multiproteico (inflamassomos), no qual induz a produção de IL-1 caracterizada como uma das principais citocina pró-inflamatória que possui atividade de ativação leucocitária (CRUVINEL *et al.*, 2010)

Nesse processo de reconhecimento, células dendríticas e os macrófagos podem atuar como células apresentadoras de antígenos (APCs), causando a potencialização da ativação de linfócitos T e B pela expressão de moléculas que coestimulam e liberam citocinas pró-inflamatórias como interleucinas (IL-1, IL-6, IL-12), TNF- α e quimiocinas, culminando no recrutamento e ativação de leucócitos e

proteínas do plasma para o local que está localizado o agente causador da agressão que origina no local uma exacerbação da resposta inflamatória e dano tecidual pela degranulação de mastócitos e de neutrófilos afim de controlar e reparar o tecido lesado (CRUVINEL *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o endotélio é feita através de uma cascata de eventos clássicos de rolamento, quimiotaxia, adesão firme e diapedese, dependente de uma classe de moléculas da superfície celular conhecida como moléculas de adesão. As principais famílias de moléculas de adesão celular incluem as selectinas, a superfamília das imunoglobulinas e as integrinas. As três importantes selectinas na adesão célula-a-célula são: a L-selectina, constitutivamente expressa em leucócitos; a P-selectina, pré-formada e armazenada nas plaquetas ou em células endoteliais; e a E-selectina, que apresenta exclusivamente em células endoteliais (MESQUITA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2015).

A superfamília de imunoglobulina inclui a molécula de adesão da célula intercelular-1 (ICAM-1) e a molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1). As integrinas são uma grande família de proteínas que medeiam à adesão, migração e ativação celular. As moléculas de adesão são expressas após estimulação por citocinas, como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) (MESQUITA *et al.*, 2008; CHANG *et al.*, 2015).

2.3. Terapia e efeitos colaterais decorrentes do uso de anti-inflamatórios não esteroidais – AINEs

Os AINEs constituem uma classe importante de medicamentos com aplicações que já duram vários séculos. O tratamento de doenças inflamatórias sobrevém o clássico aspirina (ácido acetilsalicílico) descoberta por Felix Hoffman da indústria Bayer, Alemanha, em 1897, até a ascensão dos inibidores seletivos de COX-2, fato que fez os AINEs desfrutar de um status de sucesso de bilheteria na indústria farmacêutica (RAU; KNAUS, 2008; MONTINARI, 2019; BINDU, 2020).

Até o momento, os AINEs estão entre os medicamentos de venda livre mais populares em todo o mundo, constituindo 5% de todos os medicamentos prescritos. Esse grupo de fármacos são usados principalmente para o tratamento de pacientes que sofrem de dor e condições inflamatórias, como dor crônica, osteoartrite, artrite

reumatóide, condições cirúrgicas de pós-operatório, cólicas menstruais e até mesmo sendo usado extensivamente como analgésicos e antipirético. A facilidade no acesso de AINEs faz com que eles estejam entre os mais utilizados nas práticas de automedicação. Estima-se que os Estados Unidos respondem por mais de 70 milhões de prescrições e mais de 30 bilhões de comprimidos de venda livre comercializados anualmente. No Brasil, diferentes estudos de utilização de medicamentos situam os AINEs entre os mais utilizados pela população (BUDOFF, 1979; TSUTSUMI, 2004; GUPTA; BAH, 2016; OLIVEIRA, 2019).

Uma das características dos anti-inflamatórios é sua ação analgésica, uma vez que o processo inflamatório induz a dor. Estudos tem demonstrado a existência de uma isoforma de ciclo-oxigenase, a COX-3, possivelmente uma variante da COX-1, ela é encontrada principalmente no córtex cerebral, medula espinhal e coração, tendo função semelhante à COX-2 na produção de prostaglandinas no processo inflamatório, a liberação desses mediadores inflamatórios sensibiliza os receptores nociceptivos, com conseqüente diminuição do limiar nociceptivo e aumento da capacidade de resposta à dor, a analgesia decorrente a ação dos AINEs é devido a inibição da síntese de prostaglandinas (WOOLF, 1997; BERENBAUM, 2004; POSSO, 2014).

As doenças que envolvem respostas inflamatórias e conseqüentemente que implicam dor estão entre as que mais afetam a humanidade, e influenciam de forma marcante a qualidade de vida dos indivíduos, isto faz com que a população faça o uso terapêutico recorrente de AINEs para aliviar a dor e o desconforto associado a condições crônicas, esses fármacos apesar de serem seguros, podem trazer efeitos adversos (AMERICAN SOCIETY OF HOSPITAL P, 2010; MCCARBERG, 2013).

Com relação aos efeitos deletérios dessa classe de medicamentos, a datar do ano 2000 novos anti-inflamatórios, inibidores seletivos da COX-2, prometeram diminuir esses efeitos adversos, porém trouxeram à tona a possibilidade de aumentar o risco para infarto do miocárdio e acidente vascular cerebral. Isso levou a retirada de mercado de alguns desses medicamentos, bem como no caso do Brasil, levou a ANVISA a lançar nota técnica em 2008 exigindo a venda sob prescrição em receita de controle especial, 02 vias, com retenção de uma cópia, dos chamados inibidores seletivos da COX 2 (MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, 2007; ANVISA, 2008).

Além disso, os AINEs têm uma série de outros efeitos adversos que afetam principalmente os sistemas gastrointestinal, renal e hepático (ESSEX, 2013). No trato gastrointestinal os efeitos colaterais mais comuns dos AINEs são relatados como eventos leves, como dispepsia, azia e náusea e estão mais limitados ao trato gastrointestinal (TGI) superior. Eles são facilmente perceptíveis pelo paciente e são prontamente diagnosticados na clínica (SOSTRES, 2010; DAMASCENO, 2013; NICOLAU, 2017). Como complicação do trato GI pela ação dos AINEs tem-se o efeito tóxico menos frequente, mas potencialmente mais grave dos AINEs, que ocorre nos segmentos mais distais do TGI, é frequentemente ignorado, e variam de lesões a estenose do lúmen chamada doença do diafragma, as complicações também podem levar ao surgimento de gastrites e úlceras (KIM, 2005; NICOLAU, 2017).

O rim é o segundo órgão mais afetado pelos efeitos adversos desses fármacos. Estima-se que 1-5% dos usuários de AINEs podem desenvolver efeitos adversos renais como a insuficiência renal aguda (IRA) ou crônica (IRC) (MICHELIN, 2006; HARIRFOROOSH, 2009; MUSU, 2011).

A principal preocupação associada ao uso de AINEs é a lesão renal aguda. Apesar disso, IRA e outros efeitos adversos como distúrbios de fluidos e eletrólitos raramente desenvolvem em pacientes com poucos ou nenhum fator de risco para lesão, uma história de insuficiência renal aguda torna o paciente mais propenso à versão crônica da complicação (KURTH, 2003; AGODOA, 2008).

A insuficiência renal crônica ocorre quando uma agressão, doença ou toxinas danificam os rins, resultando na remoção inadequada de líquidos e resíduos. Embora raros, os AINEs causam IRC secundária à nefrite intersticial ou necrose papilar. A IRC pode ser uma doença terminal. O risco de IRC é aumentado em pacientes que sofreram IRA (EJAZ, 2004; NDERITU, 2013). A injúria renal associada ao uso de AINEs ainda pode apresentar redução da filtração glomerular, necrose papilar renal, síndrome nefrótica com nefrite intersticial aguda (LAMEIRE, 2005; VIEUX, 2010; BROADIS, 2010).

Os AINEs também estão associados a lesão hepática induzida por drogas, que é uma condição que pode imitar a maioria dos tipos de patologias hepáticas agudas e crônicas e é a causa mais comum de insuficiência hepática aguda (REUBEN, 2010; BECHMANN, 2014). Vários AINEs foram retirados do mercado devido a reações adversas a medicamentos no fígado (bromfenaco, ibufenaco, benoxaprofeno,

droxicam, pirofenona, fenclofenaco e, mais recentemente, lumiracoxib); outros, como a nimesulida, nunca foram comercializados em alguns países ou retirados em outros (MERLANI, 2001, PAGE, 2008; DONATIL, 2016).

Os efeitos deletérios oriundos do uso de AINEs motiva a reflexão por novas abordagens a ser implementadas para evitar ou reduzir as respostas adversas, principalmente aos órgãos mais afetados como o TGI, os rins, o fígado bem como o sistema cardiovascular. Dentre as abordagens tem-se o uso de AINEs com baixo potencial tóxico, redução ou eliminação dos agentes que atuam causando injúrias e intensificação da defesa da mucosa. Porém, nem todas essas medidas têm demonstrado muito sucesso (JUNIOR, 2020; PEREIRA, 2021).

2.4. A espécie *Casimirella ampla* como fonte de moléculas bioativas

Ao longo dos tempos, produtos de origem vegetal foram a base para o tratamento de diversas patologias. A constante busca de produtos naturais que possuem compostos com propriedades farmacológicas contribuem de forma significativa para o êxodo da descoberta de substâncias com importantes aplicações terapêuticas (CALDERON *et al.*, 2009).

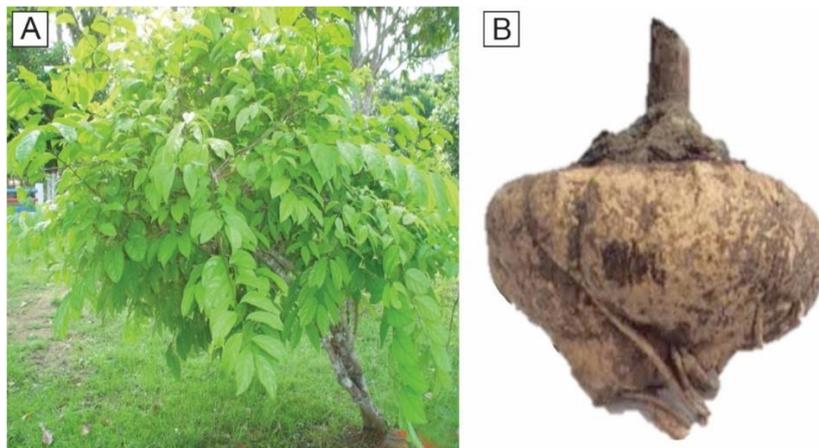
A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) define uma planta medicinal como planta ou parte dela que em sua composição contenha elementos capazes de possuir uma resposta terapêutica. As plantas com propriedades medicinais são utilizadas, há muito tempo pelos humanos, sendo incentivada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), tendo como princípio à amplificação de fitoterápicos nos tratamentos dos agravos de saúde (BORTOLUZZI; SCHMITT; MAZUR, 2020).

As plantas possuem um papel importante na saúde humana desde a antiguidade (NUNES *et al.*, 2020). Ainda persistem como sendo o tipo de tratamento mais usado no mundo nos dias atuais, especialmente em países tropicais e em países subdesenvolvidos (CARDOSO; OLIVEIRA; CARDOSO, 2019). No contexto de prospecção de novos compostos com propriedades biológicas, a biodiversidade brasileira destaca-se com uma das maiores fontes de produtos naturais. A Floresta Amazônica, possui uma região com maior biodiversidade de plantas presente no mundo, oferecendo uma grande riqueza vegetal com capacidade produtora de moléculas que possuem algum tipo de atividade biológica, isso é de grande valor para

o desenvolvimento de novas drogas e exploração biotecnológica (CALDERON *et al.*, 2009).

Dentre as plantas com potencialidade bioativa da região amazônica, encontra-se a *C. ampla* que pertence à família Icacinaceae. Esta é conhecida popularmente por surucuína, mairá ou mairã, é um arbusto que apresenta uma raiz tuberosa bastante desenvolvida, galhos angulosos, caules com tricomas simples hialinos e folhas com ápices obtusos acuminado, com bases atenuadas e rotundas (figura 2) (RIBEIRO, 2018).

Figura 2. Raiz tuberosa da *Casimirella ampla*.



Fonte: GUIMARÃES, 2005.

Existem poucos estudos sobre a espécie *C. ampla* investigando seus efeitos terapêuticos. Entre suas aplicações descritas na literatura é destacada a sua utilização para tratar lesões causadas por picadas de cobras (MING; GAUDÊNCIO; SANTOS, 1997). Estudos com o extrato etanólico de *C. ampla* apresentou redução de hemorragia causada por veneno de cobra, atividade anticoagulante, atividade proteolítica, anti-edematogênico após injeção de veneno *Bothrops jararacussu*, *Bothrops atrox* e *Bothrops jararaca* no membro posterior de camundongos (STRAUCH *et al.*, 2013). Esse fenômeno foi evidenciado também nos estudos de Guimaraes (2005), sendo possível observar que o extrato demonstrou ação inibitória em veneno de cobras das espécies *Bothrops atrox*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca*, exibindo um elevado potencial antiofídico. Além disso, o extrato foi eficaz em testes de nocicepção inflamatória, inibindo de forma significativa a nocicepção neurogênica quimicamente

induzida. Em estudos de Luiz et al. (2007) também foi possível observar que o extrato etanólico de raízes deste de *C. ampla* também tem efeito na nocicepção contra modelos neurogênicos e inflamatórios.

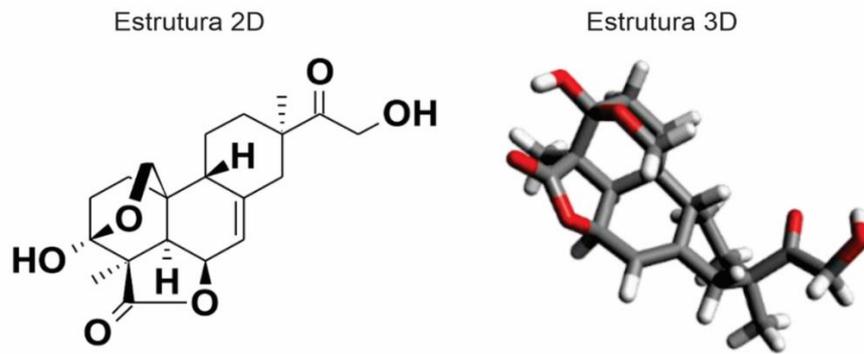
O composto isoladoannonalida foi testado em linhagens celulares de câncer humano, os tipos mais prevalentes no mundo foram estudados para avaliar a atividade citotóxica desse composto frente a essas células tumorais, sendo evidenciado a citotoxicidade significativa em HL-60 (leucemia), PC-3 (carcinoma da próstata), SF-295 (glioblastoma), HCT-116 (cólon humano) (MARQUES *et al.*, 2018).

Os diterpenos estão vastamente distribuídos em plantas e fungos e são classificados em diferentes subgrupos de acordo com sua estrutura contendo carbono resultante de diferentes arranjos do geranylgeranyl pirofosfato (GGPP), sendo este composto precursor de todos os diterpenos. (MASI; EVIDENTE, 2021; ZHANG *et al.*, 2022). Os precursores centrais geranyl pirofosfato (GPP), farnesil pirofosfato (FPP) e geranylgeranyl pirofosfato (GGPP) formam a base estrutural dos terpenos superiores em sua grande maioria. As terpeno-sintases convertem esses pirofosfatos intermediários em terpenos (PYNE; NARCROSS, 2019). Todos os terpenos são derivados de blocos de construção isomérica de 5 carbonos, o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) (ZHOU; PICHERSKY, 2020).

Os diterpenóides e outros terpenos têm sido intensamente investigados porque neutralizam a inflamação aguda, crônica e dor (LUIZ *et al.*, 2007). Além disso, são uma classe promissora de moléculas de metabólitos secundários com uma gama de atividades biológicas, incluindo antibacteriana, antiparasitária, antiviral e anticancerígena (GONZÁLEZ *et al.*, 2015).

Entre os diterpenos, os pimaranos formam um subgrupo bastante representativo que apresentam diversas atividades biológicas interessantes (REVEGLIA *et al.*, 2018; MASI; EVIDENTE, 2021). Estudos realizados por Marques (2011) proporcionou o isolamento de compostos das raízes de *C. ampla* conhecidas na literatura, sendo majoritário o diterpenóide pimaranoannonalida (15-oxo-16-ol, 3 β ,20-epóxi-3 α -hidroxi-9-epi-7-pimarano-19,6 β -olida) representado na figura 2.

Figura 3. Representação estrutural daannonalida (15-oxo-16-ol, 3 β ,20-epóxi-3 α -hidroxi-9-epi-7-pimarano-19,6 β -olida).



Fonte: NEGREIRO, 2021.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o efeito anti-inflamatório da annonalida em modelos de inflamação geral em camundongos.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Averiguar a possível atividade anti-inflamatório da annonalida oriunda da *C. ampla* em edema de pata induzido por carragenina em camundongo;
- ✓ Verificar o provável efeito anti-inflamatório da annonalida oriunda da *C. ampla* em edema de pata induzido por mediadores vasoativos: histamina e serotonina.
- ✓ Avaliar a possível ação anti-inflamatória da annonalida oriunda da *C. ampla* a partir da análise histopatológica do tecido inflamado da pata pela injeção de carragenina;
- ✓ Verificar a participação da annonalida oriunda da *C. ampla* sobre a atividade da enzima MPO nos tecidos das patas.
- ✓ Analisar o potencial efeito anti-inflamatória da annonalida oriunda da *C. ampla* no evento de migração de células inflamatórias para a cavidade peritoneal induzido por carragenina em camundongos;
- ✓ Avaliar o provável envolvimento da annonalida oriunda da *C. ampla* sobre os níveis de GSH a partir do exsudato peritoneal.

4. METODOLOGIA

4.1. Coleta do material e extração daannonalida da *Casimirella ampla*.

O composto natural isolado da planta *C. ampla* (Icacinaceae) foi coletado na região amazônica e a identificação botânica da espécie foi realizada no herbário do parque Zoobotânico da Universidade Federal do Acre, sua exsicata encontra-se depositada sob o número 12159. Registrada no Sistema Nacional de Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN) sob código AB60DA6 (Anexo I). A extração e caracterização do composto An foi feito por Marques (2011), no Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da Universidade Federal do Ceará (UFC), a partir das raízes tuberosas de *C. ampla*, que foram fragmentadas em pequenos pedaços e posteriormente trituradas, o material vegetal foi submetido à extração a frio por solventes orgânicos hexano, acetato de etila, e etanol, respectivamente, e a sua estrutura foi determinada através de cromatografia de adsorção em coluna e espectrofotometria de massa, infravermelho e de ressonância magnética nuclear.

4.2. Animais Experimentais

Para este estudo foram utilizados camundongos Swiss fêmeas, pesando entre 25-30g, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Os animais foram acondicionados em caixas com xilana + maravalha estéril (3:1), limpadas periodicamente, em ambiente com temperatura média de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e luminosidade controlada em ciclos de claro/escuro de 12 horas, com acesso a água e ração padrão *ad libitum*. Nos protocolos, os camundongos foram divididos em grupos de 6 animais cada.

4.3. Questões éticas

O presente projeto foi realizado seguindo todos os princípios e normas para a utilização de animais em projetos de pesquisa de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com a Lei Federal 11.794 de outubro de 2008, ditada pela Sociedade Brasileira de Ciências de Animais de Laboratório. O projeto foi submetido e aprovado na

comissão de ética no uso de animal (CEUA) da Universidade Federal do Piauí – UFPI sob o protocolo 020/19 (Anexo II).

4.4 Métodos experimentais utilizados nos ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório

4.4.1 Edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata por Cg é comumente utilizado para triagem de novos anti-inflamatórios (SOBEH *et al.*, 2020). Para testar a An, inicialmente, foram feitos testes com três doses do composto afim de estabelecer uma melhor dose que pudesse reverter os parâmetros anti-inflamatórios analisados e que assim fosse utilizada nos experimentos subsequentes (FURASAWA *et al.*, 2003). Antes da indução do edema, os animais foram pré-tratados por gavagem (via oral – v.o.) com salina (grupo I - controle negativo/não tratado), tween 2% com solução salina afim de comprovar que o tween (agente solubilizante) não interfere no possível efeito da An, Indo 10 mg/kg (grupo II – controle/fármaco referência), ou An (grupos III, IV e V - grupos testes) nas doses de 0,1; 1,0 e 10 mg/kg. Após 30 minutos, o edema foi induzido pela injeção intraplantar de Cg (i.pl.) de 50 µl de uma suspensão de Cg (500 µg/pata) em solução salina 0,9% na pata traseira direita dos camundongos. Um grupo recebeu apenas o agente inflamatório Cg (grupo VI – controle positivo), o grupo controle negativo recebeu apenas 50 µl de salina (0,9 %). O volume da pata foi medido antes no tempo 0 (volume basal), e após 1, 2, 3 e 4 horas da administração de Cg, utilizando um pletismômetro (Panlab LE75000) como descrito previamente (WINTER *et al.*, 1962). Após as leituras dos volumes das patas, os animais foram eutanasiados com uma dose letal de quetamina (240 mg/kg) associada a xilazina (30 mg/kg) por via i.p.

4.4.2 Avaliação histopatológica

Após a leitura do volume das patas foram retirados segmentos da região subplantar dos animais experimentais e feito a análise histológica de acordo com Sousa *et al.* (2018). Os fragmentos de tecidos das patas foram fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfato a 10%, lavados e submetidos a desidratação gradual decrescente com soluções alcólicas de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de 1h cada e posteriormente no álcool absoluto por uma hora e meia. Em seguida, o

processo de diafanização foi realizado em xilol I durante 45 min e em xilol II por mais 45 min, inclusão em parafina líquida para banho I por 15 a 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Após o derretimento e resfriamento da parafina, essa foi aparada em um bloco apropriado e cortada com auxílio de um micrótomo (LUPETEC®, MRP 09) na espessura de 4 mm. A desparafinização foi feita com xilol I por 7 min e mais 3 min com xilol II. Logo após, foi feito o processo de hidratação com álcool absoluto por 7 min, seguido de álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por 2 min cada. A coloração foi feita com hematoxilina e eosina e lavado em água corrente, foi escoado naturalmente em temperatura ambiente, em seguida as lâminas foram montadas e observadas a um microscópio de luz. As lâminas foram avaliadas por um histopatologista de acordo com os critérios propostos por Appleyard e Wallace (1995) com modificações, descritos nas tabelas que avaliam infiltrado inflamatório (tabela 1), pontuação de edema/inchaço (tabela 2) e densidade da derme (tabela 3) avaliando uma área de 45.000 μm^2 de tecido com microscopia de luz (NOVA®, Piracicaba, SP, Brasil).

Tabela 1. Avaliação dos escores de infiltração de células inflamatórias para os tecidos da pata.

Critérios	Escore
Infiltração de células inflamatórias fisiológicas	1
Infiltração de células inflamatórias de forma leve	2
Infiltração de células inflamatórias de forma moderada	3
Infiltração de células inflamatórias de forma grave	4

Fonte: Modificado de Appleyard e Wallace (1995).

Tabela 2. Avaliação dos escores microscópios de edema/inchaço nos tecidos da pata.

Critérios	Escore
Presença de edema fisiológico	1
Presença de edema leve	2
Presença de edema moderado	3
Presença de edema grave	4

Fonte: Modificado de Appleyard e Wallace (1995).

Tabela 3. Avaliação dos escores microscópios de lesão quanto a densidade da derme.

Crítérios	Escores
Presença fisiológica de espaço nas fibras colágenas	4
Presença de leves espaço nas fibras colágenas	3
Presença de moderado espaço nas fibras colágenas	2
Presença de grave espaço nas fibras colágenas	1

Fonte: Modificado de Appleyard e Wallace (1995).

4.4.3 Edema de pata induzido por mediadores inflamatórios

Para a realização do edema de pata induzido por alguns mediadores inflamatórios, será utilizada a melhor dose de An obtida no experimento de edema de pata induzido por Cg. Os animais foram pré-tratados por gavagem com solução salina 0,9% (grupo I controle negativo), Indo 10 mg/kg (grupo II – grupo controle/fármaco referência), ou An (grupo III - grupo teste). Após 30 minutos do tratamento foi administrado 50 µl de salina estéril (0,9 %), ou serotonina (100 µg/pata), ou histamina (100 µg/pata) na pata traseira direita dos animais, como adotado no modelo de Silva e colaboradores (2013). O volume da pata dos animais foi mensurado por meio de pletismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes da administração dos agentes flogísticos (volume basal) e em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min após a administração para os diferentes grupos de animais. Os resultados foram expressos como variação do volume da pata (ml).

4.4.4 Determinação da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina

Inicialmente foi administrado 250 µl de solução salina (0,9%) i.p. (grupo I - controle negativo), ou indo 10 mg/kg i.p. (grupo II – controle/fármaco referência), ou a melhor dose de An v.o. (grupo III – teste). Trinta minutos depois, foi administrado Cg (250 µl / 500 µg/cavidade) i.p. nos camundongos dos grupos II, III e em um grupo que recebeu apenas Cg (grupo IV – controle positivo). Logo após o período de 4 horas, foi feita a eutanásia dos animais e a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 ml de solução

salina tamponada com fosfato de heparina (PBS) para colher células peritoneais segundo a metodologia adaptada por Chaves et al. (2013).

Para a contagem total de células presentes no líquido peritoneal foi utilizado 20 µL do lavado após ser diluído em líquido de Turkey (380 µl) e realizada a contagem em uma câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 40x. Os resultados foram expressos como número total de leucócitos por cavidade. Foram coletados também líquido peritoneal para posteriormente realizar dosagem dos níveis de GSH.

4.4.5 Atividade da enzima mieloperoxidase

A atividade da MPO foi medida de acordo com o método previamente descrito por Bradley e colaboradores (1982). Amostras da região subplantar das patas dos animais foram retiradas e foi utilizado 50-100 mg de tecido e colocados em tampão de brometo de hexadeciltrimetilamônio (HTAB) com fosfato de potássio. Posteriormente, foram trituradas em um macerador Polytron (13000) e foram centrifugados a 4000 rotações por minuto (rpm) durante 15 min a 4°C. O sobrenadante foi misturado com dihidrocloridrato de o-dianisidina e 1 % de peróxido de hidrogênio e a atividade da MPO na reação foi analisada através da medição da absorbância a 450 nm em um leitor de microplaca. Os resultados foram expressos como unidade de MPO por mg de tecido (UMPO/mg de tecido). A unidade da atividade de MPO foi definida pela conversão de 1 µmol de H₂O₂ em água em 1 minuto a 22 °C.

4.4.6 Análises das concentrações de Glutathiona

A concentração de GSH em amostras de exsudato peritoneal foi analisada conforme o método descrito por Sedlak e Lindsay (1968). Para determinação dos níveis de grupos sulfidrílicos não-protéicos, amostras dos exsudatos peritoneais dos animais foram centrifugados a 1500 rpm durante 15 minutos em uma temperatura de 4°C. Em seguida, alíquotas em volumes de 400µL foram misturadas em 320µL de água destilada e 80µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para que ocorra a precipitação de proteínas. Os microtubos com o material foram centrifugados novamente por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C. Após esse tempo, 400µL do sobrenadante foi adicionado a 800µL de tampão Tris 0,4M (pH 8.9) e 20µL de ácido ditio-nitrobenzoico - DTNB (reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada

por 3 minutos e a absorbância lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protéicos foram expressas em μg de GSH/g de tecido.

4.4.7 Análise estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm erro padrão da media (EPM) de certo número de eventos (n) em cada grupo, com exceção dos escores histológicos que foram expressos como mediana. Para realização dos testes estatísticos foi utilizado o *software* Prisma versão 6.0 da *GraphPad Software*. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

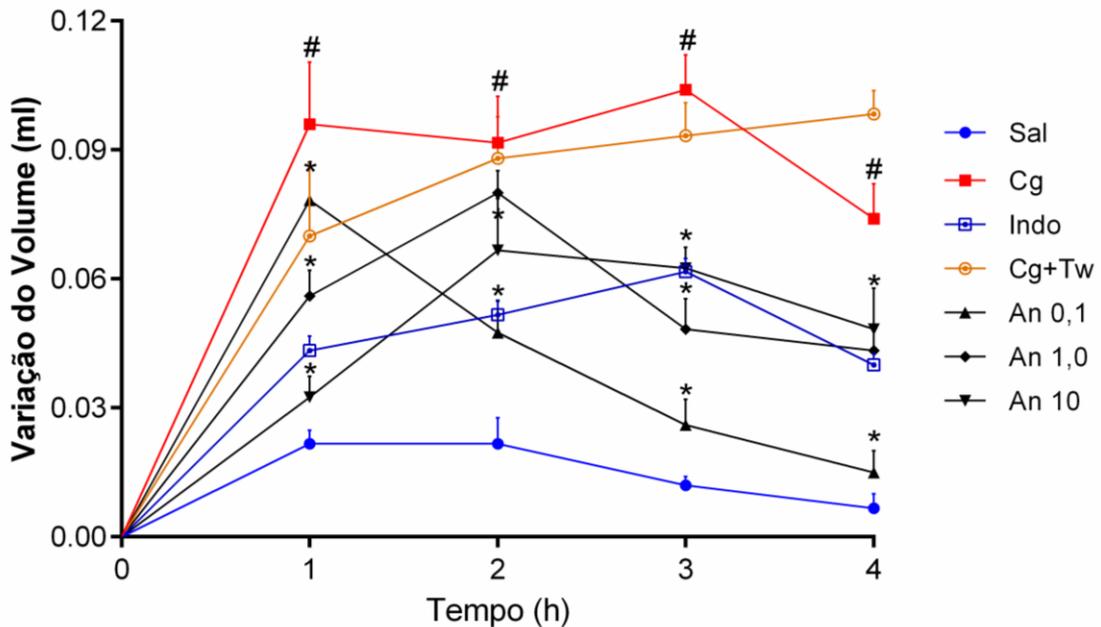
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Efeito da Annonalida extraída da *C. ampla* sobre o edema de pata induzido por carragenina

O composto An da *C. ampla* nas doses de 0,1; 1,0 e 10 mg/kg foi testado com finalidade de estabelecer uma melhor dose que possa ter efeito anti-inflamatório eficaz que pode ser aplicada nos ensaios posteriores. Foi observado que a dose de destaque frente as doses testadas foi a de 0,1 mg/kg como pode-se observar na figura 4. Uma vez que a referida dose provocou redução do edema de maneira significativa em todo o curso temporal (1h - $0,067 \pm 0,008$ ml; 2h - $0,047 \pm 0,007$ ml; 3h - $0,026 \pm 0,006$ ml; 4h - $0,015 \pm 0,005$ ml) em relação ao grupo que recebeu o agente inflamatório Cg (1h - $0,105 \pm 0,014$ ml; 2h - $0,098 \pm 0,010$ ml; 3h - $0,110 \pm 0,007$ ml; 4h - $0,080 \pm 0,007$ ml) e ao grupo que recebeu Cg e foi pré-tratado com twenn (1h - $0,070 \pm 0,016$ ml; 2h - $0,088 \pm 0,010$ ml; 3h - $0,098 \pm 0,007$ ml; 4h - $0,094 \pm 0,004$ ml). Comprovando assim que o twenn não participa durante a resposta anti-inflamatório do composto. Foi notório também a diminuição do edema nas outras doses observadas de An 1 mg/kg (1h - $0,056 \pm 0,006$ ml; 2h - $0,076 \pm 0,004$ ml; 3h - $0,044 \pm 0,007$ ml; 4h - $0,040 \pm 0,004$ ml) e em An 10 mg/kg (1h - $0,0325 \pm 0,005$ ml; 2h - $0,060 \pm 0,012$ ml; 3h - $0,047 \pm 0,002$ ml; 4h - $0,062 \pm 0,005$ ml), porém a dose de 0,1 mg/kg foi a mais expressiva diminuindo de forma contundente os efeitos edematogênicos. Foi observado ainda que a referida dose teve um efeito redutor do edema mais satisfatório (com diferenças

significativas) que o grupo que foi tratado com indo (1h - $0,043 \pm 0,003$ ml; 2h - $0,051 \pm 0,012$ ml; 3h - $0,062 \pm 0,003$ ml; 4h - $0,040 \pm 0,002$ ml). Portanto, a dose do diterpeno An utilizada para os demais testes inflamatórios foi a dose de 0,1 mg/kg.

Figura 4. Efeito do diterpenoannonalida sobre o edema de pata induzido por carragenina.



Os animais foram pré-tratados com An (0,1; 1,0 ou 10 mg/kg) 30 min antes da administração de Cg (500 µg) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 1, 2, 3 e 4 horas da administração do agente edemotogênico. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, Cg: carragenina, An: Annonalida, Cg+Tw: grupo pré-tratado com tween e induzido Carragenina, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

O agente flogístico Cg é um agente pró-inflamatório amplamente utilizado em modelos de inflamação com um método introduzido por Winter em 1962, sendo utilizado até os dias de hoje para pesquisa de novos agentes com potencial anti-inflamatório. O edema induzido por Cg é caracterizado por edema bifásico, com duas fases, a primeira é marcada pela ação de mediadores como histamina, serotonina e bradicinina que permite o aumento da permeabilidade vascular ocorrendo dentro de 1 - 2 horas. A segunda se caracteriza com produção excessiva de prostaglandinas, óxido nítrico (CRUNKHORN; MEACOCK, 1971; CARDIA *et al.*, 2018), com infiltração

de células polimorfonucleares (DAMASCENO *et al.*, 2014), e várias citocinas como IL-1 β , IL-6, IL-10 e TNF- α (RAMOS *et a.*, 2020) ocorrendo dentro de 3 - 4 horas.

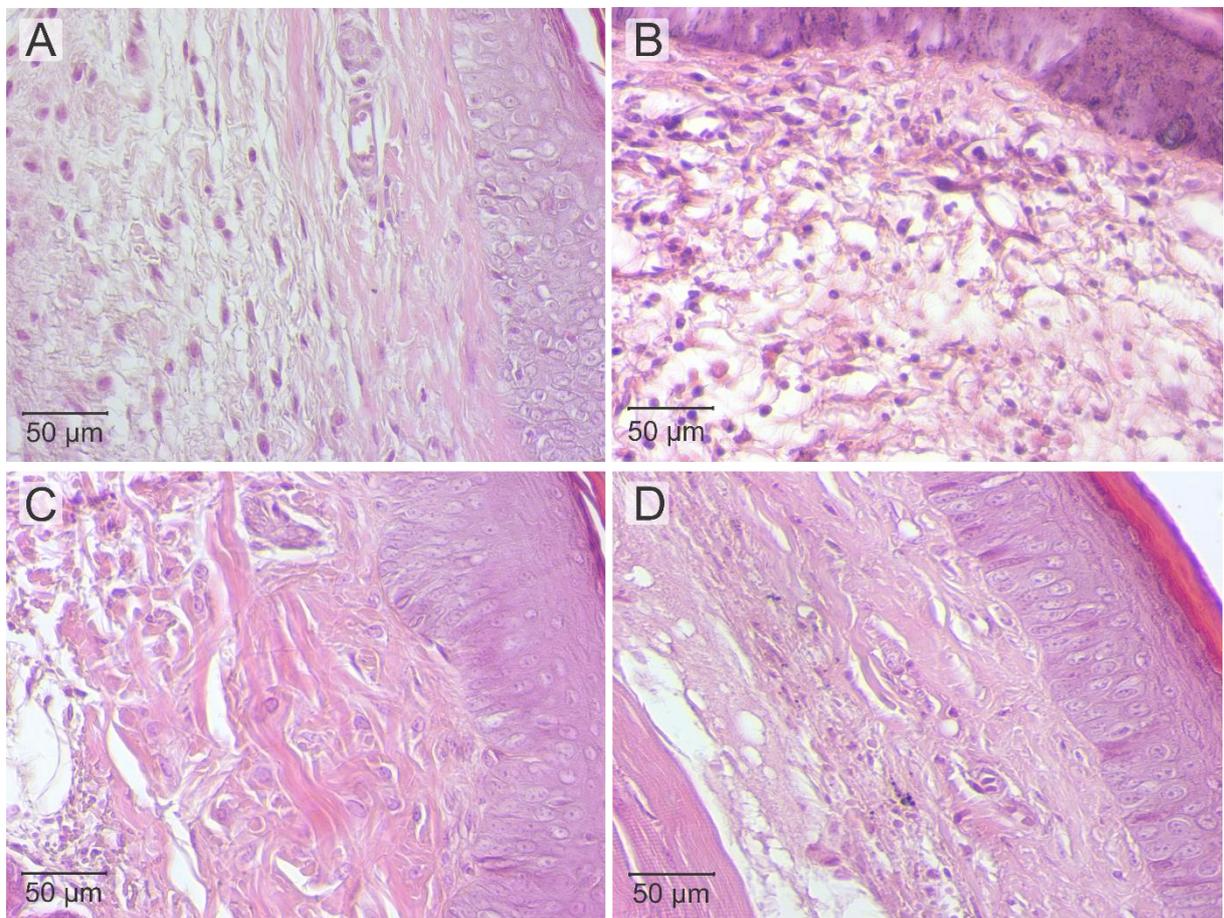
O presente estudo mostrou que os camundongos que receberam Cg subplantar, apresentaram aumento no volume da pata atingindo um pico máximo na terceira hora após a injeção, já o grupo que recebeu um pré-tratamento com An 0,1 mg/kg apresentou um volume de pata menos edemaciado, com resultados significacantes em todo curso da inflamação, no entanto, com mais expressão na terceira e quarta hora após a indução do edema, pode-se evidenciar também que o composto An 0,1 mg/kg teve efeito mais expressivo que os obtidos pelo grupo indo. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Sobeh e colaboradores (2020), na qual o diterpeno de *Thymus fontanesii* mostrou efeito redutor do edema na pata em camundongos.

5.2 Efeito da Annonalida sobre os critérios microscópicos de lesão do tecido da pata no edema induzido por Carragenina

Os tecidos das patas dos animais foram submetidos a análise histopatológica de forma randomizada através de investigação fotomicrográfica (figura 5). No qual os resultados mostram que os animais do grupo salina apresentaram as menores pontuações de escores de edema/inchaço ($0,143 \pm 0,143$) (figura 6) e escores de células inflamatórias presentes no tecido ($0,143 \pm 0,143$) (figura 7) com análise feita de forma semiquantitativa, já nos escores de densidade da derme o grupo apresentou as maiores pontuações ($3,857 \pm 0,143$) em que foi avaliado a presença de espaço nas fibras colágenas dos tecidos (figura 8), demonstrando a preservação da arquitetura tecidual das patas assim como a manutenção das condições homeostáticas do tecido subplantar como demonstrado na figura 5A. Em contraste, o grupo que recebeu injeção de Cg apresentou significativa mudança em todos os parâmetros histopatológicos estudados (figura 5B), com alta pontuação no escore de edema/inchaço ($3,857 \pm 0,143$) (figura 6), alta infiltração de células inflamatórias ($2,857 \pm 0,143$) (figura 6) e mudança do aspecto tecidual com maior espaçamento das fibras colágenas observados no escore de densidade da derme ($0,143 \pm 0,143$) (figura 7). O diterpeno An 0,1 mg/kg foi capaz de melhorar de forma significativa os parâmetros avaliados (figura 5C), diminuindo os escores de edema/inchaço ($1,143 \pm 0,143$) (figura 6), infiltrado inflamatório ($1,833 \pm 0,167$) (figura 7) e preservando a densidade da derme

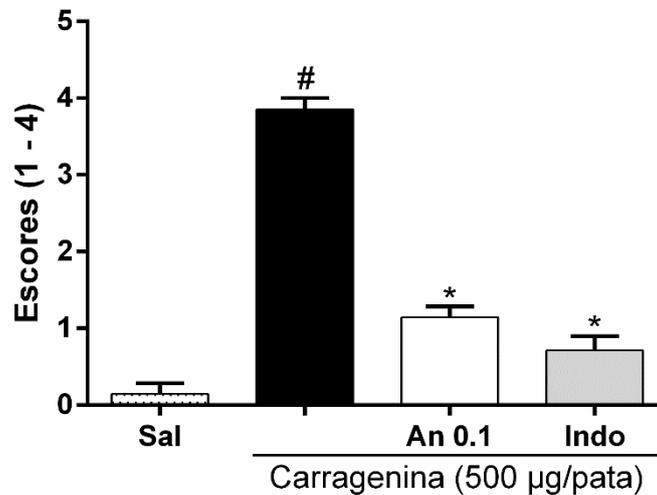
da pata dos animais ($3,167 \pm 0,167$) (figura 8). Como esperado, por seus mecanismo anti-inflamatórios já estabelecidos, a indo 10 mg/kg reduziu os escores microscópicos de edema/inchaço ($0,714 \pm 0,184$) e infiltrado inflamatório ($0,500 \pm 0,223$) como observado nas figuras 6 e 7 respectivamente, além de preservar as fibras colágenas ($3,43 \pm 0,202$) quando comparado ao grupo Cg (figura 8), podendo ser observado esses parâmetros na figura 5D.

Figura 5. Microfotografia (50 μm) retratando o efeito daannonalida sobre os danos microscópicos de lesão provocado pelo edema de pata induzido por carragenina.



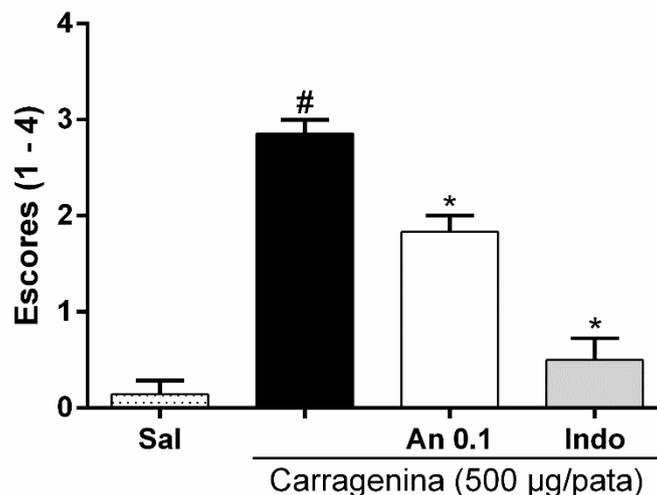
Tecido da pata do animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% i.pl. (A); tecido da pata do animal que recebeu Cg 500 μg /pata (B); tecido da pata do animal com edema por Cg e tratado com An (0,1 mg/kg, v.o.) (C); tecido da pata de um animal com edema por C e tratado com Indo 10 mg/kg, i.p. (D). Os valores são expressos como média \pm E.P.M. por grupo, analisada pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Newman Keuls. Coloração feita por hematoxilina e eosina (HE). Microfotografia com objetiva de 40x. Fonte: Autoria própria.

Figura 6. Efeito da annonalida no escore de Edema/inchaço na avaliação histopatológica da pata



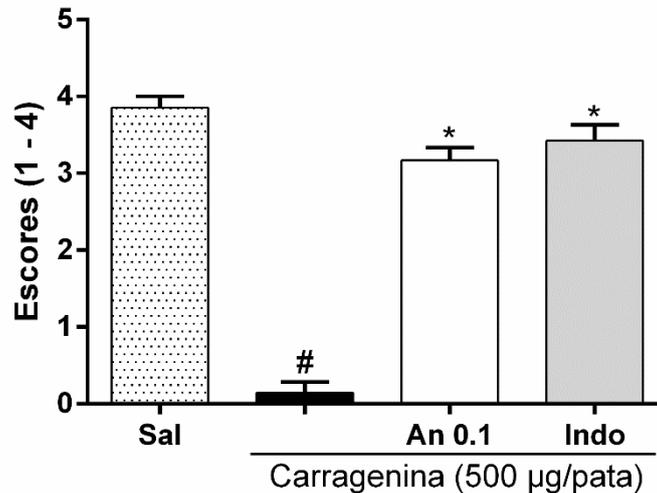
Os escores microscópicos de lesão foram mensurados após o edema de pata induzido por Cg (500 µg/pata). Os valores foram representados como média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. Legenda: Sal: Salina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

Figura 7. Efeito da Annonalida no escore de infiltrado inflamatório na avaliação histopatológica da pata



Os escores microscópicos de lesão foram mensurados após o edema de pata induzido por Cg (500 µg/pata). Os valores foram representados como média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. Legenda: Sal: Salina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

Figura 8. Efeito daannonalida no escore de densidade da derme na avaliação histopatológica da pata.



Os escores microscópicos de lesão foram mensurados após o edema de pata induzido por Cg (500 µg/pata). Os valores foram representados como média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. Legenda: Sal: Salina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prism 6.0.

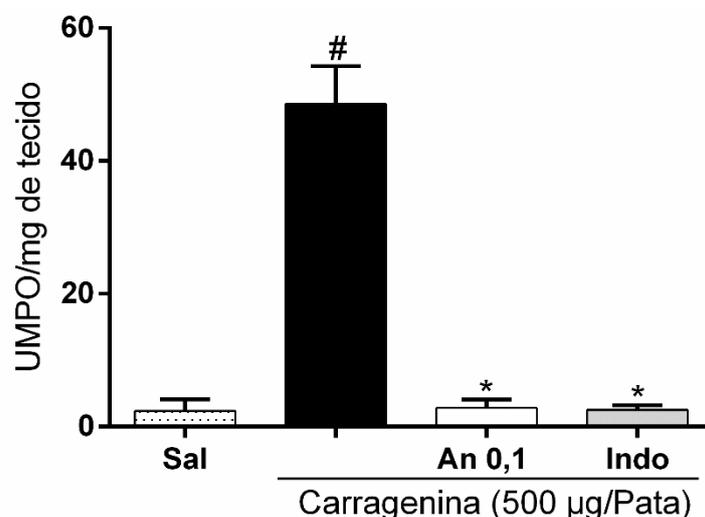
Os danos microscópicos nos tecidos das patas foram evidentes com alterações nos parâmetros histopatológicos como é perceptível na figura 5 e complementados pelos gráficos representados na figura 6, 7 e 8. Tais escores de edema, infiltração de células inflamatórias e o espaçamento das fibras colágenas no grupo Cg representam de forma clara características de um processo inflamatório. Os achados mostraram que o composto An atenuou significativamente os danos microscópicos nos tecidos das patas dos camundongos, por preservar a estrutura tecidual, manter a densidade, diminuir o influxo de células inflamatórias e inibição da ação edematogênica provocada pela Cg. De maneira semelhante ocorreu em animais com tratamento coma droga de referência (Indometacina), e no grupo salina 0,9% foi mantida todos estrutura basal e escores normais. A análise histopatológica contribui de forma imprescindível para averiguar o percurso da inflamação, tendo em vista que a resolução do processo inflamatório leva a restauração da homeostase do tecido agredido. Uma falha na resolução da inflamação pode desencadear uma resposta crônica com dano tecidual grave e fibrose com conseqüente desenvolvimento de diversos tipos de patologias (ROCK *et al.*, 2010). Alguns estudos com diterpenos

apoiam a ação desses compostos durante a inflamação quando observado aspectos histológicos, o Triptolite um diterpenoide extraído de *Tripterygium wilfordii* Hook. f. demonstrou efeito na supressão da inflamação em camundongos em modelos de artrite, com efeito na histologia desse tecido (LIN *et al.*, 2007), o carnosol também atenuou o dano renal e escores de lesão (ZHENG *et al.*, 2018), Li et al. (2019) também demonstrou em seu estudo o efeito protetor na lesão pulmonar com *Salvia officinalis*.

5.3 Efeito da Annonalida sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata

A região subplantar das patas dos animais foram retiradas para analisar os tecidos quanto a atividade da enzima MPO. Como observado na figura 9, o grupo Cg apresentou uma intensa atividade da enzima MPO nos tecidos das patas ($48,58 \pm 2,846$ UMPO/mg) em relação ao grupo salina ($2,309 \pm 1,006$ UMPO/mg). O grupo tratado com An 0,1 mg/kg apresentou redução significativa de MPO ($2,847 \pm 0,552$ UMPO/mg) que se aproximou inclusive dos valores basais dos animais que receberam apenas solução salina ($2,886 \pm 0,8675$ UMPO/mg). Sendo evidenciado pela análise estatística que constatou que não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados obtidos dos animais do grupo que recebeu An (0,1 mg/kg) + Cg (500 µg/pata) e do grupo que recebeu somente salina. Foi notório também que o grupo indo teve efeito reduzindo a enzima MPO de forma significativa ($2,539 \pm 1,006$ UMPO/mg) em relação ao grupo que recebeu apenas Cg.

Figura 9. Efeito da annonalida sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata.



A atividade da MPO foi determinada por espectrofotometria após a retirada da região subplantar das patas dos animais. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de unidade da enzima

MPO/mg de tecido. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prism 6.0.

A enzima MPO é expressa de forma predominantemente em grânulos azurófilos de neutrófilos (NIU *et al.*, 2013; ODOBASIC *et al.*, 2016) produzindo ácido hipocloroso, um potente oxidante que após reagir com H_2O_2 e Cl^- que provoca danos aos tecidos (COLOMBO *et al.*, 2018). A atividade da enzima MPO tem sido considerada um marcador confiável por refletir bioquimicamente a atividade dos polimorfonucleares durante os eventos inflamatórios agudos (CAN *et al.*, 2015). Evidências mostram que a enzima MPO é um marcador indireto de infiltração de neutrófilos nos tecidos (CARDIA *et al.*, 2018), sendo muito estudada em condições inflamatórias, também por estar envolvida durante o estresse oxidativo e contribuindo para a patogênese da inflamação (LOREAL *et al.*, 2008).

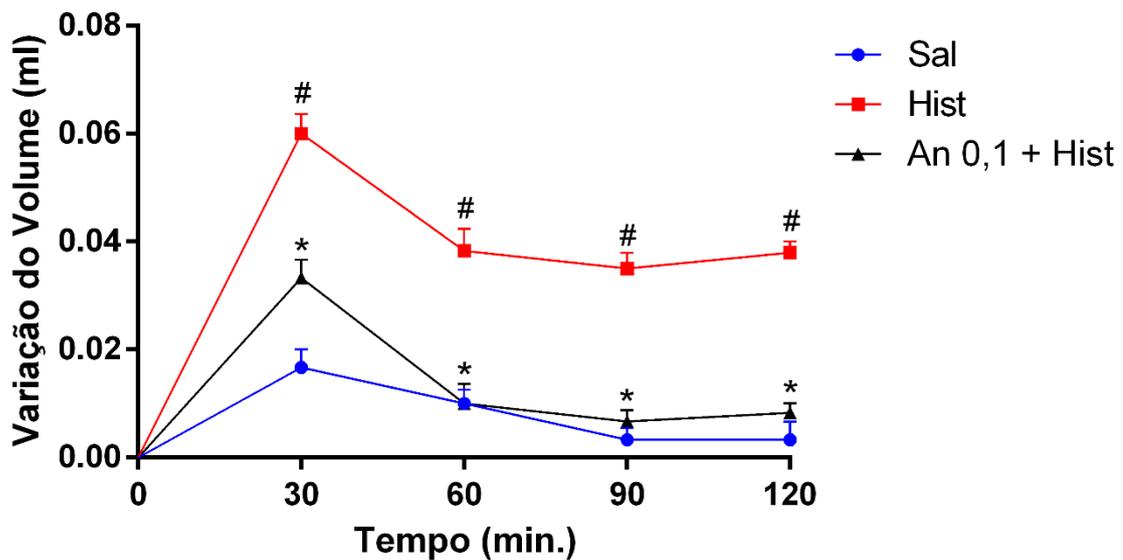
Estudos com terpenos de plantas demonstraram redução da atividade da enzima MPO, como o estudo de Fachini-Queiroz *et al.* (2012) com óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., Pinho *et al.* (2014) no edema de pata por Cg, com cânfora em edema geral (SILVA-FILHO *et al.*, 2014), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) em modelo de colite experimental (JUHÁS *et al.*, 2009), carnosol no tecido renal (LI *et al.*, 2019). Neste estudo ficou evidente que houve a redução de MPO com o uso do composto An 0,1 mg/kg, isso indica de forma indireta a redução de polimorfonucleares para os tecidos das patas dos animais tratado com este composto, de forma congruente foi observado no grupo tratado com indo 10 mg/kg, um fármaco de referência utilizado durante processos inflamatórios, em contrapartida o grupo Cg apresentou valores altos da enzima MPO indicando uma aumentada atividade bioquímica dos polimorfonucleares nos tecidos.

5.4 Ação da Annonalida sobre o edema de pata induzido por Histamina

A injeção i.pl. de Histamina (100 μ g/pata) ocasionou um intenso efeito edematogênico, com pico máximo observado nos primeiros 30 minutos ($0,0600 \pm 0,0036$ ml), que é confirmado quando contrastado com os valores obtidos dos animais do grupo salina ($0,017 \pm 0,003$ ml). Após os 30 minutos iniciais o edema provocado pela histamina começou a decair, porém acentuada e manteve uma constante nos tempos: 60 min ($0,038 \pm 0,004$), 90 min ($0,035 \pm 0,003$) e 120 min ($0,038 \pm 0,002$), o

que pôde ser verificado pelo acentuado volume das patas dos animais que receberam o estímulo flogístico. A An (0,1 mg/kg) foi capaz de diminuir o edema associado à injeção i.pl. de histamina de maneira significativa em todos o curso temporal estabelecido: 30 min ($0,033 \pm 0,003$), 60 min ($0,010 \pm 0,004$), 90 min ($0,007 \pm 0,002$) e 120 min ($0,008 \pm 0,002$). Como apresentado na figura 10.

Figura 10. Ação daannonalida sobre o edema de pata induzido por histamina.



Os animais foram pré-tratados com 0,1 mg/kg de An 30 min antes da administração de histamina (100 μ g) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min da administração do agente edematogênico. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Hist; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, Hist: Histamina, An: Annonalida. Fonte: Graphpad prism 6.0.

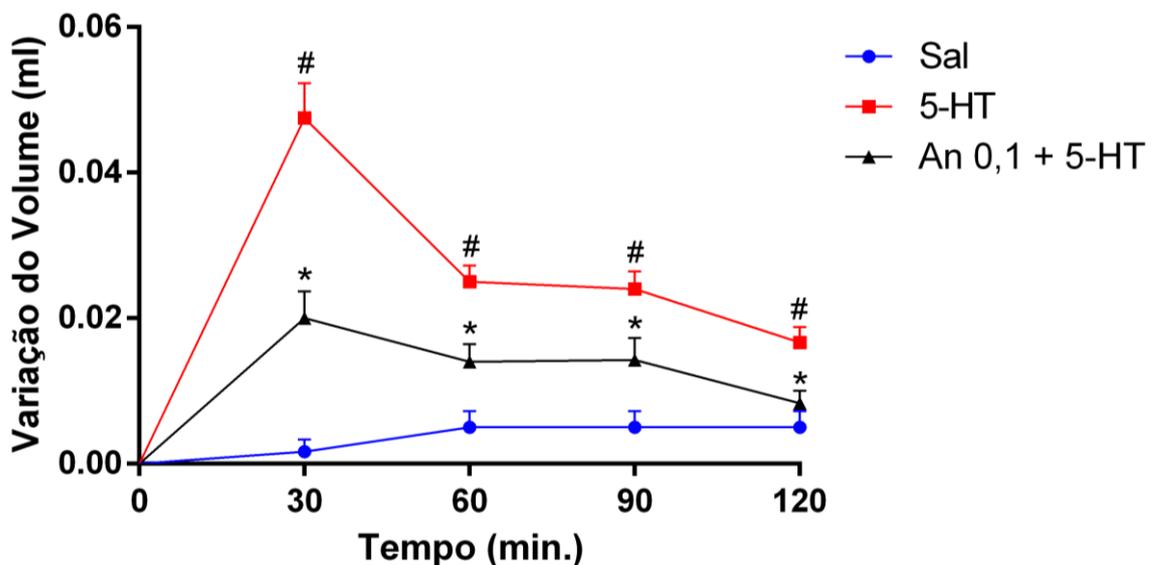
A histamina é um importante mediador químico que causa vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de ser um potente mediador inflamatório, promove alterações vasculares e teciduais com atividade quimioatrativa (BRANCO *et al.*, 2018). Como foi observado, a administração de histamina levou um aumento do volume da pata dos camundongos, pois houve um aumento de líquido no espaço intersticial causado por suas propriedades vasodilatadoras na microcirculação. O composto An diminuiu o edema causado por histamina em todos os tempos de leitura, podendo também possuir uma participação em eventos vasculares por receptores específicos, uma vez que a histamina possui receptores presente no endotélio, como

o receptor H1 sendo capaz de impulsionar a migração celular e vasodilatação (THNGAM *et al.*, 2018), demonstrando assim um efeito inibitório na resposta inflamatória por esse composto testado.

5.5 Ação da Annonalida sobre o edema de pata induzido por Serotonina

No edema de pata induzido por Serotonina (5-HT 100 µg/pata), o grupo controle positivo recebeu injeção i.pl. do inflamógeno que causou um edema intenso nos primeiros 30 minutos nas patas dos camundongos em relação aos que receberam apenas solução salina i.pl. (figura 11) (5-HT – $0,047 \pm 0,005$ ml versus Sal – $0,002 \pm 0,002$ ml), e foi diminuindo paulatinamente, mas mantendo diferença significativa para o grupo salina. O diterpenóide An reduziu de forma significativa o edema provocado por Serotonina em todos os tempos testados e de forma acentuada no pico máximo do edema no tempo 30 min ($0,020 \pm 0,004$ ml) e seguiu diminuindo o volume do edema consideravelmente nos tempos posteriores 60 min ($0,014 \pm 0,002$ ml), 90 min ($0,014 \pm 0,003$ ml) e 120 min ($0,008 \pm 0,002$ ml).

Figura 11. Ação da annonalida frente ao edema de pata induzido por Serotonina.



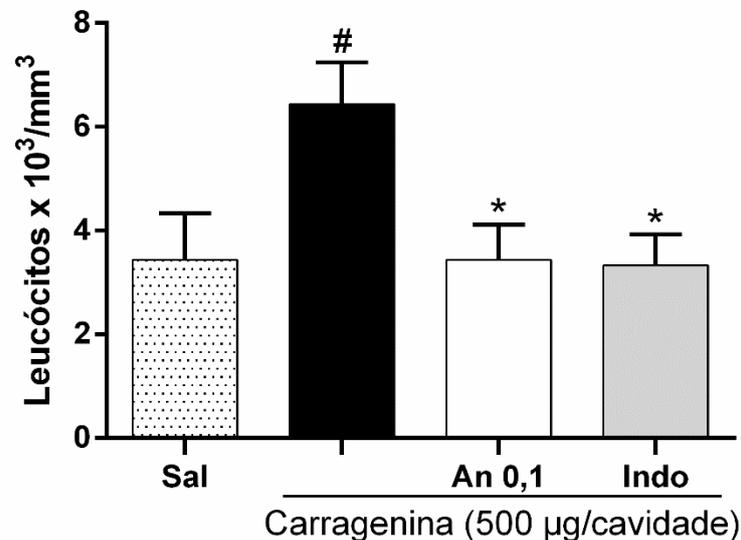
Os animais foram pré-tratados com 0,1 mg/kg de An 30 min antes da administração de Serotonina (100µg) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30, 60, 90 e 120 min da administração do agente edemotogênico. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo 5-HT; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, 5-HT: Serotonina, An: Annonalida. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

As aminas (histamina e serotonina) possuem ação sobre vasculatura, agindo rapidamente nos vasos sanguíneos, desencadeando vasodilatação com aumento de fluidos para o compartimento intersticial (RAMOS *et al.*, 2020). São produzidas e ativam o endotélio vascular, expressando moléculas de adesão que medeia o rolamento, adesão celular e transmigração de neutrófilos (COSTA *et al.*, 2020). Esses eventos ocorrem normalmente na inflamação. Desta forma, como foi evidenciado durante o edema induzido por serotonina, An agiu coibindo a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular por promover a inibição do edema de pata induzido por serotonina durante todos os tempos testados. Sugerindo assim uma ação de An frente ao mediador serotonina e em eventos vasculares relacionados ao processo inflamatório.

5.6 Efeito da Annonalida na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina

O líquido peritoneal foi coletado dos animais após a eutanásia e as células leucocitárias foram contadas em câmara de Neubauer. Analisando a figura 12, pode-se observar que o diterpeno An (0,1 mg/kg) atenuou em 53,40% ($3,438 \pm 0,341$) a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal dos animais quando comparado ao grupo Cg ($6,438 \pm 0,404$), ficando evidente o aumento na contagem de leucócitos ocasionada pela injeção do agente inflamógeno ao se deparar com os valores do grupo Salina ($3,438 \pm 0,450$). Pode ser observado também que não houve diferença significativa na contagem total de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais que receberam Indo na dose de 10 mg/kg ($3,333 \pm 0,241$) quando comparado ao grupo An.

Figura 12. Efeito da Annonalida na Contagem total de células durante a peritonite induzida por carragenina.



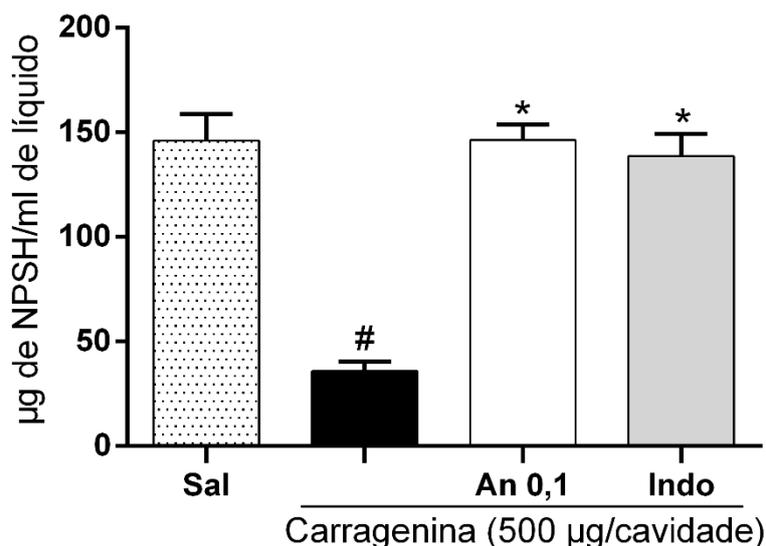
Os animais foram pré-tratados com 0,1 mg/kg de An 30 min antes da indução da peritonite com administração de Cg (500µg) intraperitoneal. Os valores foram representados como média ± E.P.M. de leucócitos totais. *p<0,05 comparado com o grupo Carragenina; #p<0,05 comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prism 6.0.

O modelo de peritonite também é usado para o rastreamento de drogas anti-inflamatórias, podendo ser avaliados o acúmulo de exsudato na cavidade pleural e migração de leucócitos para a cavidade. (FACHINI-QUEIROZ *et al.*, 2012). Foi relatado que inibição da migração leucocitária para a cavidade peritoneal pode ser resultante de inibição da expressão de substâncias quimiotáticas e / ou por supressão de produção de moléculas de adesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; SOBEH *et al.*, 2020). No referido modelo, An na dose de 1 mg/kg reduziu de forma significativa o número de células migradas, com resultados comparáveis ao grupo salina, esse fenômeno também foi observado no grupo que recebeu indo 10 mg/kg, em contraste com o grupo Carragenina, cujo o número de células que migraram para a cavidade peritoneal foram o dobro em relação ao grupo salina. Esses dados corroboram com dados de estudos anteriores com terpenos que demonstram efeito anti-inflamatório na diminuição da migração de leucócitos para a cavidade pleural quando pré-tratados com extratos com *Thymus fontanesii* (SOBEH *et al.*, 2020), tomilho (*Thymus vulgares*) (FACHINI-QUEIROZ *et al.*, 2012), gengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) (MELO *et al.*, 2011).

5.7 Ação da Annonalida sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal

Os grupos dos animais que receberam Cg apresentaram como resultado um alto consumo dos níveis de GSH ($35,67 \pm 1,594 \mu\text{gNPSH/ml}$) quando comparado ao grupo que recebeu apenas solução salina ($146,0 \pm 5,669 \mu\text{gNPSH/ml}$). O grupo tratado com o diterpeno An na dose de $0,1 \text{ mg/kg v.o.}$ apresentou menor nível de consumo de GSH ($146,3 \pm 2,948 \mu\text{gNPSH/ml}$) mantendo significativamente os níveis da enzima. O grupo An apresentou diferença significativa ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo salina e com o grupo que recebeu a droga de referência indo 10 mg/kg ($138,6 \pm 4,756 \mu\text{gNPSH/ml}$) (figura 13).

Figura 13. Ação da annonalida sobre os níveis de glutaciona no exsudato peritoneal.



Os animais foram pré-tratados com $0,1 \text{ mg/kg}$ de An 30 min antes da indução da peritonite com administração de Cg ($500 \mu\text{g}$) intraperitoneal. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de leucócitos totais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo Cg; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal: Salina, Hist: Histamina, An: Annonalida, Indo: Indometacina. Fonte: Graphpad prisma 6.0.

Esse agente antioxidante endógeno natural é capaz de atuar na prevenção das lesões oxidativas nas células e tecidos, sendo um importante biomarcador de oxidação tecidual (ROSSI *et al.*, 2006). Os dados obtidos mostraram que os animais que foram tratados com An $0,1 \text{ mg/kg}$ que sofreram peritonite não tiveram consumo significativo dos níveis de GSH, mantendo-se os níveis semelhantes aos níveis do

grupo que recebeu apenas salina 0,9%. Esses dados reforçam os resultados obtidos com a enzima MPO, que de forma indireta mostrou uma menor infiltração de polimorfonucleares em grupos tratados com An, pois a manutenção dos níveis de GSH também significa menor número dessas células, uma vez que são produtoras de espécies reativas de oxigênio durante o processo inflamatório. Os estudos de Juhás et al. (2009) com diterpenos extraídos do alecrim (*Rosmarinus officinalis*) demonstram possuir efeitos antioxidante no curso da colite experimental, o que respalda o potencial antioxidante dessa classe de compostos.

Uma variedade de diterpenos têm sido investigados pelo seu potencial anti-inflamatório e apresentados resultados positivos (HERAS; HORTELANO, 2009; GONZÁLEZ *et al.*, 2015; NUNES *et al.*, 2020). Os resultados apresentados corroboram com essa premissa uma vez que o composto An apresentou resultados satisfatórios nos testes de inflamação geral provocada por agentes flogísticos.

6. CONCLUSÃO

Os estudos de compostos naturais em conjunto com informações fisiofarmacológicas e etnobotânicas contribuem de forma significativa para o surgimento de novos fármacos. Os resultados alcançados deste estudo sugerem que o composto diterpenóide An, extraído da *C. ampla* tem efeito durante a resposta anti-inflamatória e na atenuação do estresse oxidativo. Estes achados foram comprovados pela redução significativa de parâmetros inflamatórios analisados nos edemas de pata induzidos pelos agentes edematogênicos, Cg, serotonina e histamina; nas avaliações bioquímicas da enzima MPO e GSH, migração de leucócitos para a cavidade peritoneal e avaliação histopatológica do tecido subplantar das patas. Diante disso, o presente trabalho revela um potencial farmacológico do composto An como um promissor agente anti-inflamatório, podendo servir como fonte de novas moléculas naturais para uso na inflamação, necessitando assim de mais estudos que possa comprovar os seus efeitos de forma mais abrangente para aplicabilidades farmacológicas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGODOA, L. Y.; FRANCIS, M. E.; EGGERS, P.W. Association of analgesic use with prevalence of albuminuria and reduced GFR in US adults. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 51, p. 573-583, 2008.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SANCHEZ-PATAN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.
- ALMEIDA A.A., SILVA R.O., NICOLAU L.A., DE BRITO T.V., DE SOUSA D.P. BARBOSA A.L., DE FREITAS R.M., LOPES L.D., MEDEIROS J.R., FERREIRA P.M. Physio-pharmacological Investigations About the Anti-inflammatory and Antinociceptive Efficacy of (+)-Limonene Epoxide. **Inflammation**, v.40, p. 511. 2017.
- AMERICAN SOCIETY OF HOSPITAL P, AMERICAN SOCIETY OF HEALTH SYSTEM P, TETON DATA S, STAT! REF ELECTRONIC MEDICAL L. AHFS DRUG INFORMATION. BETHESDA, MD: **American Society of Health-System Pharmacists**, Inc; 2010.
- APPLEYARD, C. B; WALLACE, J. L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **American Journal of Physiology**, v. 269, p. 119-25, 1995
- BATISTA, J. A.; MAGALHÃES, D. A.; SOUSA, S. G.; FERREIRA, J.; PEREIRA, C. M. C.; LIMA, J. V. N.; ALBUQUERQUE, I. F., BEZERRA, N. L. S .D.; BRITO, T. V., MONTEIRO, C. E. S.; FRANCO, A. X., DI LENARDO, D., OLIVEIRA, L. A., FEITOSA, J. P. A.; PAULA, R. C. M.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; OLIVEIRA, J. S., VASCONCELOS, D. F. P.; SOARES, P. M. G.; BARBOSA, A. L. R. Polysaccharides derived from *Morinda citrifolia* Linn reduce inflammatory markers during experimental colitis. **Journal of ethnopharmacology**, v.248, p.112303, 2020.
- BECHMANN, L. P.; MANKA, P.; BEST, J.; SANER, F. H.; PAUL, A.; CANBAY, A. *et al.* Drug-induced liver injury as predominant cause of acute liver failure in a monocenter study. **Deutsche Medizinische Wochenschrift**, v. 139, p. 878–882, 2014.
- BERENBAUM, F. COX-3: Fact or fancy? **Joint Bone Spine**, v. 71, p. 451-453, 2004.
- BINDU, S.; MAZUMDER, S.; BANDYOPADHYAY, U. Non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and organ damage: A current perspective. **Biochemical pharmacology**, v.180, p. 114147, 2020.
- BONECCHI, R.; GRAHAM, G. J. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 7, n. 224, p. 1-7, 2016.
- BORTOLUZZI, M. M.; SCHMITT, V; MAZUR, C. E. Effect of herbal medical plants on anxiety: a brief review. **Research Society and Development**, v. 9, n.2, p. 47, 2020.

- BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood**, v. 60, n.3, p. 618-622, 1982.
- BRANCO, A.; YOSHIKAWA, F.; PIETROBON, A. J.; SATO, M. N. Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. **Mediators of inflammation**, p. 9524075, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (**ANVISA**). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº 79, de 04 de novembro de 2008. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2008/res0079_04_11_2008.html
- BROADIS, E.; BARBOUR, L.; O'TOOLE, S.; FYFE, A.; FLETT, M.; IRWIN, G.; RAMAGE, I. J. Bilateral ureteric obstruction secondary to renal papillary necrosis. **Pediatric Surgery International**, v. 26, n. 8, p. 867-920, 2010.
- BUCKLEY, C. D.; GILROY, D. W.; SERHAN, C. N. Proresolving lipid mediators and mechanisms in the resolution of acute inflammation. **Immunity**, v. 40, n. 3, p. 315-27, 2014.
- BUDOFF, P. W. Use of mefenamic acid in the treatment of primary dysmenorrhea. **JAMA**, v. 241, n. 25, p. 2713–2716, 1979.
- CALDERON, L. A.; JARDIM I. S.; ZULIANI J. P.; ALMEIDA, S. A.; CIANCAGLINI, P.; SILVA, L. H. P.; STÁBELI, R. G. Amazonian Biodiversity: A View of Drug Development for Leishmaniasis and Malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 26, p. 1011-1023, 2009.
- CAN, G.; AYVAZ, S.; CAN, H.; DEMIRTAS, S.; AKSIT, H.; YILMAZ, B.; KORKMAZ, U.; KURT, M.; KARACA, T. The Syk Inhibitor Fostamatinib Decreases the Severity of Colonic Mucosal Damage in a Rodent Model of Colitis. **Journal of Crohn's & colitis**, v.9, n. 10, p. 907–917, 2015.
- CARDIA, G.; SILVA-FILHO, S. E.; SILVA, E. L.; UCHIDA, N. S.; CAVALCANTE, H.; CASSAROTTI, L. L.; SALVADEGO, V.; SPIRONELLO, R. A.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. Effect of Lavender (*Lavandula angustifolia*) Essential Oil on Acute Inflammatory Response. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 2018, p. 1413940, 2018.
- CARDOSO, J. C.; OLIVEIRA, M. E. B.S.; CARDOSO, F. C. Advances and challenges on the in vitro production of secondary metabolites from medicinal plants. **Horticultura Brasileira**, v. 37, n. 2, p. 124-132, 2019.
- CHANG, C. Z.; WU, S. C.; LIN, C. L.; KWAN, A. L. Valproic acid attenuates intercellular adhesion molecule-1 and E-selectin through a chemokine ligand 5 dependent mechanism and subarachnoid hemorrhage induced vasospasm in a rat model. **Journal of inflammation (London, England)**, v.12, n. 27, 2015.

CHAVES, L. S.; NICOLAU, L. A. D.; SILVA, R. O.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; ARAGÃO, K.S. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 35, p.93–100, 2013.

COLOMBO, B. B.; FATTORI, V.; GUAZELLI, C.; ZANINELLI, T. H.; CARVALHO, T. T.; FERRAZ, C. R.; BUSSMANN, A.; RUIZ-MIYAZAWA, K. W.; BARACAT, M. M.; CASAGRANDE, R.; VERRI, W. A., Jr (2018). Vinpocetine Ameliorates Acetic Acid-Induced Colitis by Inhibiting NF- κ B Activation in Mice. **Inflammation**, v. 41, n. 4, p. 1276–1289, 2018.

COSTA, L.E.C.; BRITO, T.V.; DAMASCENO, R.O.S.; SOUSA, W.M.; BARROS, F.C.N.; SOMBRA, V.G.; PAULA, R.C.M.; BARBOSA, A.L.R.; FREITAS, A.L.P. Chemical structure, anti-inflammatory and antinociceptive activities of a sulfated polysaccharide from *Gracilaria intermedia* algae. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 159, p. 966-975, 2020.

CRUNKHORN, P.; MEACOCK, S. C. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenin. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 3, p. 392–402, 1971.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN T. T. T.; SOUZA A. W. S.; SILVA N. P.; ANDRADE L. E. C. Immune system – Part I Fundamentals of innate immunity with emphasis on molecular and cellular mechanisms of inflammatory response. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50. n. 4, p. 434-461, 2010.

DAMASCENO, S. R. B. *et al.* Role of the NO/KATP pathway in the protective effect of a sulfated-polysaccharide fraction from the algae *Hypnea musciformis* against ethanol-induced gastric damage in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 2, p. 320-328, 2013.

DAMASCENO, S. R. B.; OLIVEIRA, F. R. A. M. ; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F. C.; SILVA, I. S.; SOUSA, F. B. M.; SILVA , R. O.; SOUSA, D. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive and inflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, p. 58-66, 2014.

DONATI, M.; CONFORTI, A.; LENTI, M. C.; CAPUANO, A.; BORTOLAMI, O.; MOTOLA, D.; MORETTI, U.; VANNACCI, A.; RAFANIELLO, C.; VACCHERI, A.; ARZENTON, E.; BONAIUTI, R.; SPORTIELLO, L.; LEONE, R.; DILI-IT STUDY GROUP. Risk of acute and serious liver injury associated to nimesulide and other NSAIDs: data from drug-induced liver injury case–control study in Italy. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v. 82, p. 238–248, 2016.

EJAZ, P.; BHOJANI, K.; JOSHI, V.R. NSAIDs and kidney. **Journal of the Association of Physicians of India**, v. 52, p. 632-640, 2004.

ESSEX, M. N.; ZHANG, R.Y.; BERGER, M. F.; UPADHYAY, S.; PARK, P. W. Safety of celecoxib compared with placebo and non-selective NSAIDs: cumulative meta-

analysis of 89 randomized controlled trials. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 12, n. 4, p. 465-477, 2013.

FACHINI-QUEIROZ, F. C.; KUMMER, R.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; CARVALHO, M. D.; CUNHA, J. M.; GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. Effects of Thymol and Carvacrol, Constituents of *Thymus vulgaris* L. Essential Oil, on the Inflammatory Response. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.2012, p. 657026, 2012.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumor Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1158 – 1164, 2003.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 2, p. 1- 6, 2006.

GODIN, A. M. **Atividades do 2-Ftalimidoetanol e do Nitrato de 2-Ftalimidoetila, análogos ftalimídicos destituídos do anel glutarimídico, em modelos experimentais de dor e inflamação**. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, 2014.

GONZÁLEZ, Y.; TORRES-MENDOZA, D.; JONES, G. E.; FERNANDEZ, P. L. Marine Diterpenoids as Potential Anti-Inflammatory Agents. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, p. 263543, 2015.

GUIMARÃES, C. L. S. **Estudo do efeito antinociceptivo e antiofídico do extrato etanólico das raízes de surucuína, *Humirianthera ampla* (miers). 2005**. Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental), Núcleo de saúde, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2005.

GUPTA, A.; BAH, M. NSAIDs in the Treatment of Postoperative Pain. **Current Pain and Headache Reports**, v. 20, n. 11, p. 62, 2016.

HERAS, B.L; HORTELANO, S. Molecular basis of the anti-inflammatory effects of terpenoids. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v. 8, n. 1, p. 28–39, 2009.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, J. N.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2868-2885, 2007.

JUHÁS, S.; BUKOVSKÁ,, A.; CIKOS, S.; CZIKKOVÁ, S.; FABIAN, D.; KOPPEL, J. Anti-inflammatory effect of *Rasmanirus officinalis* essential oil in mice. **Acta Veterinaria Brno**, v. 78, p. 121-127, 2009.

JÚNIOR, G. J. D.; LEMOS, S. I. A. BRITO, T. V.; PEREIRA, C. M. C.; JUNIOR, J. S. C.; FERREIRA, J. S.; RODRIGUES, L. R.; LIMA, J. V. N.; SILVA, C. E.; FRANCO, M. A. X.; SOARES, P. M. G.; ALVES, E. H. P.; VASCONCELOS, D. F. P.; BARROS, F.

C. N.; FREITAS, A. L. P.; BARBOSA, A. L. R. Macromolecule extracted from *Gracilaria caudata* reduces inflammation and restores hepatic function in nimesulide-induced hepatic damage. **Journal of Applied Phycology**, v. 32, p. 1511-1520, 2020.

KAWAHARA, K.; HOHJOH, H.; INAZUMI, T.; TSUCHIYA, S.; SUGIMOTO, Y. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin e receptors. **Biochim Biophys Acta**, v. 1851, n. 4, p. 414-21, 2015.

KIM, J. H.; KIM, Y.S.; SONG, G.G.; PARK, J.J.; CHANG, H.I. Protective effect of astaxanthin on naproxen-induced gastric antral ulceration in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 514, n. 1, p. 53–59, 2005.

KURTH, T.; GLYNN, R. J.; WALKER, A. M. *et al.* Analgesic use and change in kidney function in apparently healthy men. **American Journal of Kidney Diseases**, v. 42, p. 234-244, 2003.

LAMEIRE, N.; VAN BIESEN, W.; VANHOLDER, R. Acute renal failure. **Lancet**, v. 365, n. 9457, p. 417-430, 2005.

LI, Q.; LIU, L.; SUN, H.; CAO, K. Carnosic acid protects against lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. **Experimental and therapeutic medicine**, v. 18, n. 5, p. 3707–3714, 2019.

LIN, N.; LIU, C.; XIAO, C.; JIA, H.; IMADA, K.; WU, H.; ITO, A. Triptolide, a diterpenoid triepoxide, suppresses inflammation and cartilage destruction in collagen-induced arthritis mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, n.1, p. 136–146, 2007.

LORIA, V., DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, n. 135625, p. 1–4, 2008.

LUIZ, A. P.; MOURA, J. D.; MEOTTI, F. C.; GUGINSKI, G.; GUIMARÃES, C. L.; AZEVEDO, M. S.; RODRIGUES, A. L.; SANTOS, A. R. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 355-363, 2007.

MARQUES, R. A. **Estudo Químico e Avaliação Quimiopreventiva de *Humirianthera ampla*, *Simarouba versicolor* e Cinco Espécies do Gênero *Lippiall*. 2011**, Tese (Doutorado em Química), Curso de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

MARQUES, R. A.; GOMES, A.; BRITO, M. V.; SANTOS, A.; SILVA, G. S.; LIMA, L. B.; NUNES, F. M.; MATTOS, M. C.; OLIVEIRA, F. C. E.; PESSOA, C. O.; MORAES, M. O.; FÁTIMA, Â.; FRANCO, L. L.; SILVA, M. M.; DANTAS, M. D. A.; SANTOS, J. C. C.; FIGUEIREDO, I. M.; SILVA-JÚNIOR, E. F.; AQUINO, T. M.; ARAÚJO-JÚNIOR, J. X.; OLIVEIRA, M. C. F.; GUNATILAKA, A. A. L. Annonalide and derivatives: Semisynthesis, cytotoxic activities and studies on interaction of annonalide with DNA. **Journal of Photochemistry and Photobiology. B, Biology**, v. 179, p. 156–166, 2018.

MARTÍN, A. R.; VILLEGAS, I.; LA CASA, C.; DE LA LASTRA, C. A. Resveratrol, a polyphenol found in grapes, suppresses oxidative damage and stimulates apoptosis during early colonic inflammation in rats. **Biochemical pharmacology**, v.67, p. 1399–1410, 2004.

MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, J.; BADIMON, L. Mechanisms Underlying the Cardiovascular Effects of COX-Inhibition: Benefits and Risks. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2215-2227, 2007.

MASI, M.; EVIDENTE, A. Sphaeropsidin A: A Pimarane Diterpene with Interesting Biological Activities and Promising Practical Applications. **Chembiochem: A European Journal of Chemical Biology**, v. 22, n. 23, p. 3263–3269, 2021.

MCCARBERG, B.; TENZER, P. Complexities in the pharmacologic management of osteoarthritis pain. **Current Medical Research and Opinion**, 2013.

MELO, G. A.N.; GRESPAN, R.; FONSECA, J. P.; FARINHA, T. O.; DA SILVA, E. L.; ROMERO, A. L.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. Inhibitory effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) essential oil on leukocyte migration in vivo and in vitro. **Journal of Natural Medicines**, v. 65, n. 1, p. 241–246, 2011.

MERLANI, G.; FOX, M.; OEHEN, H. P.; CATHOMAS, G.; RENNER, E. L.; FATTINGER, K. *et al.* Fatal hepatotoxicity secondary to nimesulide. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 57, p. 321–326, 2001.

MESQUITA Jr, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W. M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, p. 66 – 81, 2008.

MICHELIN, A. F.; FERREIRA, A. A. P.; BITAR, V.G.; LOPES, L. C. Renal Toxicity of the Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors: Celecoxib and Rofecoxib. **Revista de Ciências Médicas**, v.15, p. 321-332, 2006.

MING, L. C.; GAUDÊNCIO, P.; SANTOS, V. P. Plantas medicinais: uso popular na reserva extrativista Chico Mendes – Acre. **Botucatu: CEPLAN/UNESP**. 165p, 1997.

MONTINARI, M.R.; MINELLI, DE CATERINA, S. R. The first 3500 years of aspirin history from its roots - A concise summary. **Vascular Pharmacology**, v. 113, p. 1–8, 2019.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta Fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2016.

MUSU, M.; FINCO, G.; ANTONUCCI, R.; POLATI, E.; SANNA, D.; EVANGELISTA, M. *et al.* Acute nephrotoxicity of NSAID from the foetus to the adult. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 15(12), p. 1461-1472, 2011.

NDERITU, P.; DOOS, L.; JONES, P. W.; DAVIES, S.J., KADAM, U. T. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and chronic kidney disease progression: a systematic review. **Family Practice**, v. 30, n. 3, p. 247-255, 2013.

NEGREIRO, J. M. **Estudo in silico da atividade catalítica da lipase de *Fusarium oxysporum* f. sp. *tracheiphilum* na bioconversão do diterpenoannonalida e seus derivados acilados.** 2021. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2021.

NICOLAU, L. A. D.; CARVALHO, N. S.; PACIFICO, D.M.; ARAGÃO, K. S.; VERAS, L. M. C. SOUZA, M. H. L. P.; LEITE, J. R. S. A.; MEDEIROS, J. V. R. Epiisopiloturine hydrochloride, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus* leaves, protects against naproxen-induced gastrointestinal damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 87, p.188-195, 2017.

NUNES, C. R.; ARANTES, M. B.; PEREIRA, S. M. F.; CRUZ, L. L.; PASSOS, M. S.; MORAES, L. P.; VIEIRA, I. J. C.; OLIVEIRA, D. B. Plants as Sources of Anti-Inflammatory Agents. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 16, p. 3726, 2020.

OKUSADA, K.; NAKAMOTO, K.; NISHIDA, M.; FUJITA-HAMABE, W.; KAMIYA, K.; MIZUSHINA, Y.; SATAKE, T.; TOKUYAMA, S. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthal, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 1, p. 103–107, 2011.

OLIVEIRA, E. L. P.; SILVA, A. C.; SILVA, R. M.; SEVERINI, L. A.; MELO, H. A.; LAGROTA-CANDIDO J.; QUIRICO-SANTOS, T. Inflammasome and its clinical impact: literature review. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v.11, n.1, p.96-102, 2012.

OLIVEIRA, M. T. P. **Efeito anti-inflamatório do MHTP, uma nova molécula do tipo alcaloide tetrahydroisoquinólico.** 2014. 114 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

PAGE, M.; CHRISTIN, F.; HAYI-SLAYMAN, D.; BAILLON, J.J.; BER, C.E., DELAFOSSE, B.; DUMORTIER, J.; RIMMELÉ, T. Acute liver failure due to a treatment by nimesulide: another case and review. **Annales Françaises D'anesthésie Et De Réanimation**, v. 27, p. 742–746, 2008.

PAUL, W. E. **Fundamental Immunology.** Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, 7 ed. 2013.

PEREIRA, C. M. C.; JUNIOR, G. J. D.; LIMA, J. V. N.; LEMOS, S. I. A.; RODRIGUES, L. R.; FERREIRA, J. S.; ARAUJO, A. S. M. L.; OLIVEIRA, J. C.; MONTEIRO, C. E.; FRANCO, A. X.; ALVES, E. H. P.; SILVA, F. G. O.; FILGUEIRAS, M. C.; SOARES, P. M. G.; VASCONCELOS, D. F. P.; OLIVEIRA, J. S.; BRITO, T. V.; BARBOSA, A. L. R. Phosphatidylinositol 3-kinase gamma participates in nimesulide-induced hepatic damage. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 73, p. 496–504, 2021.

PINHO, R. J.; AGUIAR, R. P.; SPIRONELLO, R. A.; SILVA-COMAR, F. M. S.; SILVA-FILHO, S. E.; NOGAMI, E. M.; BERSANI-AMADO, C.A.; CUMAN, R. K. N. Hepatoprotective effect of pretreatment with rosemary and ginger essential oil in experimental model of acetaminophen-induced injury. **British Journal of Pharmaceutical Research**, v.4, n, 18, p. 2126, 2014.

POSSO, I. P.; ASHMAWI, H. A. Tratamento farmacológico da dor aguda. In: Grünenthal. Tratamento Farmacológico da Dor Aguda e Crônica. São Paulo: **Europa Press**, p. 3-15, 2014.

PYNE, M. E.; NARCROSS, L.; MARTIN, V. Engineering Plant Secondary Metabolism in Microbial Systems. **Plant physiology**, v. 179, n. 3, p. 844–861, 2019.

RAMOS, A. G. B.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, M. S. A.; PESSOA, R. T.; NETO, L. J. L.; PASSOS, F. R. S.; COUTINHO, H. D. M.; IRITI, M., QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Antiedematogenic and Anti-Inflammatory Activity of the Monoterpene Isopulegol and Its β -Cyclodextrin (β -CD) Inclusion Complex in Animal Inflammation Models. **Foods (Basel, Switzerland)**, v. 9, n. 5, p. 630, 2020.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6° Ed. Editora: Elsevier, 2007.

REUBEN, A.; KOCH, D. G.; LEE, W. M. Acute Liver Failure Study Group. Drug-induced acute liver failure: results of a US multicenter, prospective study. **Hepatology** v.52, p, 2065–2076, 2010.

REVEGLIA, P.; CIMMINO, A.; MASI, M.; NOCERA, P.; BEROVA, N.; ELLESTAD, G.; EVIDENTE, A. Pimarane diterpenes: Natural source, stereochemical configuration, and biological activity. **Chirality**, v. 30, n. 10, p. 1115–1134, 2018.

RIBEIRO, R. G. **Estudo etnobotânico e físico-químico da batata-mairá (Casimirella spp. –Icacinaceae)**. 2018. 126 folhas. Dissertação (Ciências Biológicas (Botânica)) - Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2018.

ROSSI, R.; DALLE-DONNE, I.; MILZANI, A.; GIUSTARINI, D. Oxidized forms of glutathione in peripheral blood as biomarkers of oxidative stress. **Clinical Chemistry**, v.52, n.7, p.1406–1414, 2006.

RUBIO, L.; MARIA-JOS, M.; MARIA-PAZ, R. Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and antiinflammatory active principles. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 943–953, 2013.

SÁ, R. C. S.; Andrade, L. N.; Oliveira, R. R. B.; Sousa, D. P. A review on anti-inflammatory activity of phenylpropanoids found in essential oils. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 19, n. 2, p. 1459–1480, 2014.

- SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, n. 1, p. 192-205, 1968.
- SHAZHNI, J. R. A.; RENU, A.; VIJAYARAGHAVAN, P. Insights of antidiabetic, anti-inflammatory and hepatoprotective properties of antimicrobial secondary metabolites of corm extract from *Caladium x hortulanum*. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 25, n. 8, p. 1755–1761, 2018.
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria & Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320-328. 2011.
- SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; JÚNIOR, R. G. O.; ALMEIDA, R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmacia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.
- SILVA, S. C. D. **Caracterização farmacológica pré-clínica da atividade anti-inflamatória de novos derivados N-Acilhidrazônicos. 2015.** Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica/PPGIT. Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2015.
- SILVA-FILHO, S. E.; SILVA-COMAR, F. M. S.; WIIRZLER, L. A. M.; PINHO, R. J., GRESPAN, R.; BERSANI-AMADO, C. A.; CUMAN, R. K. N. Effect of camphor on the behavior of leukocytes in vitro and in vivo in acute inflammatory response. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n.12, p. 2031-2037, 2014.
- SOBEH, M.; REZQ, S.; CHEURFA, M.; ABDELFATTAH, M.; RASHIED, R., EL-SHAZLY, A. M.; YASRI, A.; WINK, M.; MAHMOUD, M. F. *Thymus algeriensis* and *Thymus fontanesii*: Chemical Composition, In Vivo Antiinflammatory, Pain Killing and Antipyretic Activities: A Comprehensive Comparison. **Biomolecules**, v. 10, n. 4, p. 599, 2020.
- SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research: Clinical Gastroenterology**, v.24, n. 2, p. 121-132, 2010.
- SOUSA, S. G.; OLIVEIRA, L. A.; MAGALHÃES, D. A.; BRITO, T. V.; BATISTA, J. A.; PEREIRA, C. M. C.; COSTA, M. S.; MAZULO, J. C. R.; FILGUEIRAS, M. C.; VASCONSELOS, D. F. P.; SILVA, D. A.; BARROS, F. C. N.; SOMBRA, V. G., FREITAS, A. L. P.; PAULA, R. C. M.; FEITOSA, J. P. A.; BARBOSA, A. L. R. Chemical structure and anti-inflammatory effect of polysaccharide extracted from *Morinda citrifolia* Linn (Noni). **Carbohydrate Polymers**, v. 197, p. 515–523, 2018.

STANKOVIC, N.; MIHAJILOV-KRSTEV, T.; ZLATKOVIC, B.; STANKOV-OVANOVIC, V.; MITIC, V.; JOVIC, J.; COMIC, L.; KOCIC, B.; BERNSTEIN, N. Antibacterial and antioxidant activity of traditional medicinal plants from the Balkan Peninsula.

Wageningen Journal of Life Sciences, v. 78, p. 21-28, 2016.

STRAUCH, M. A.; TOMAZ, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; RICARDO, H. D.; CONS, B. L.; FERNANDES, F. F.; EL-KIK, C. Z.; AZEVEDO, M. S.; MELO, P. A. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 50–58, 2013.

STRAUCH, M. A.; TOMAZ, M. A.; MONTEIRO-MACHADO, M.; RICARDO, H. D.; CONS, B. L.; FERNANDES, F. F.; EL-KIK, C. Z.; AZEVEDO, M. S.; MELO, P. A. Antiophidic activity of the extract of the Amazon plant *Humirianthera ampla* and constituents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 145, n. 1, p. 50–58, 2013.

TABAS, I.; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. **Science (New York, N.Y.)**, v. 339, n. 6116, p.166–172, 2013.

TASNEEM, S.; LIU, B.; LI, B.; CHOUDHARY, M. I.; WANG, W. Molecular pharmacology of inflammation: Medicinal plants as anti-inflammatory agents. **Pharmacological Research**, 139, 126–140, 2019.

THANGAM, E. B.; JEMIMA, E. A.; SINGH, H.; BAIG, M. S.; KHAN, M.; MATHIAS, C. B.; CHURCH, M. K.; SALUJA, R. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. **Frontiers in Immunology**, v. 9, p. 1873, 2018.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **American Journal of Physiology - Regulatory, Integrative and Comparative Physiology**, v. 288 p. R345-R353, 2005.

TSUTSUMI, S.; GOTOH, T.; TOMISATO, W.; MIMA, S.; HOSHINO, T.; HWANG, H-J.; TAKENAKA, H.; TSUCHIYA, T.; MORI, M.; MIZUSHIMA, T. Endoplasmic reticulum stress response is involved in nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced apoptosis. **Cell Death & Differentiation**, v. 11, n. 9, p. 1009–1016, 2004.

VÁZQUEZ-FRESNO, R.; ROSANA, A.; SAJED, T.; ONOOKOME-OKOME, T.; WISHART, N. A.; WISHART, D. S. Herbs and Spices- Biomarkers of Intake Based on Human Intervention Studies - A Systematic Review. **Genes & Nutrition**, v. 14, p. 18, 2019.

VIEUX, R.; DESANDES, R.; BOUBRED, F.; SEMAMA, D.; GUILLEMIN, F.; BUCHWEILLER, M. C.; FRESSON, J.; HASCOET, J. M. Ibuprofen in very preterm infants impairs renal function for the first month of life. **Pediatric Nephrology**, v. 25, n. 2, p. 267-74, 2010.

VIRSHETTE, S. J.; PATIL, M. K.; SOMKUWAR, A. P. A review on medicinal plants used as anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmacognosy Phytochemistry**, v. 8, p. 1641–1646, 2019.

WINAND, L.; SESTER, A.; NETT, M. Bioengineering of Anti-Inflammatory Natural Products. **ChemMedChem**, v. 16, n. 5, p. 767–776, 2021.

WINTER, C. A.; RISLEY E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, 1962.

WOOLF, C. J.; ALLCHORNE, A.; SAFIEH-GARABEDIAN, B.; POOLE, S. Cytokines, nerve growth factor and inflammatory hyperalgesia: the contribution of tumour necrosis factor α . **British Journal of Pharmacology**, v.121, p. 417-424, 1997.

ZHANG, A.; XIONG, Y.; FANG, J.; JIANG, X.; WANG, T.; LIU, K.; PENG, H.; ZHANG, X. Diversity and Functional Evolution of Terpene Synthases in Rosaceae. **Plants (Basel, Switzerland)**, v. 11, n. 6, p. 736, 2022.

ZHANG, R.; WU, S.; DING, Q.; FAN, Q.; DAI, Y.; GUO, S.; YE, Y.; LI, C.; ZHOU, M. Recent advances in cell membrane-camouflaged nanoparticles for inflammation therapy. **Drug Delivery**, v. 28, n. 1, p. 1109 –1119, 2021.

ZHENG, Y.; ZHANG, Y.; ZHENG, Y.; ZHANG, N. Carnosol protects against renal ischemia-reperfusion injury in rats. **Experimental animals**, v. 67, n. 4, p. 545–553, 2018.

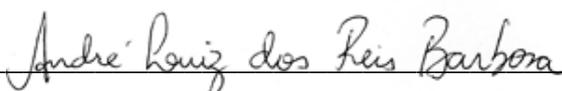
ZHOU, F.; PICHERSKY, E. More is better: the diversity of terpene metabolism in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 55, p. 1–10, 2020.

ANEXO I - Declaração de acesso ao Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN)

Declaro para os devidos fins que o trabalho de conclusão de curso intitulado: **AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO DO DITERPENO ANNONALIDA ORIUNDO DA *Casimirella ampla* (Miers) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE INFLAMAÇÃO GERAL**, desenvolvido em cumprimento à exigência para obtenção do título de bacharel em Biomedicina, pelo discente Antônio Kleiton de Sousa e orientação do professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

()	Não é abrangido pelo escopo da Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, regulamentada pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, por não implicar em acesso ao patrimônio genético ou ao seu conhecimento tradicional associado.
-----	---

(X)	()	Foi desenvolvido de acordo com a Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015, regulamentada pelo Decreto nº 8.772, de 11 de maio de 2016, e:
		Não apresenta prazo para cadastramento das atividades de acesso ao patrimônio genético ou ao seu conhecimento tradicional associado, por estar no âmbito da:
		() Resolução CGEN nº 6, de 20/03/2018
		() Resolução CGEN nº 7, de 20/03/2018
		() Resolução CGEN nº 8, de 20/03/2018
		() Resolução CGEN nº 10, de 19/06/2018
		() Resolução CGEN nº 13, de 18/09/2018
		() Resolução CGEN nº 16, de 09/10/2018
		() Orientação Técnica CGEN nº 7, de 18/09/2018
		() Orientação Técnica CGEN nº 10, de 09/10/2018
(X)	Possui acessos ao patrimônio genético e/ou ao seu conhecimento tradicional associado, devidamente cadastrados , com o número de registro: A8DC0E1	



Professor orientador

SIAPE: 1690196

ANEXO II – Carta de aprovação no comitê de ética no uso de animais (CEUA)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Ministro Reis Velloso, Av. São Sebastião, n. 2819, Parnaíba, Piauí, Brasil; CEP: 64204-035
 Telefone (86) 3323-5251 e-mail: ceuacmv@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva daannonalida oriunda da Humirianthera ampla e de seu derivado semissintético de bromo em modelos de inflamação**", registrada nº 020/19, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa do Curso de Fisioterapia do Campus Ministro Reis Velloso/UFPI** que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de Pesquisa Científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data **13/12/2019**.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	Agosto/ 2019 à Julho/ 2023
Espécie/Linhagem/raça	Camundongos (<i>Mus musculus</i>/ Swiss)
Nº de Animais	353
Peso/ Idade	25-30g
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério Central da Universidade Federal do Piauí

Parnaíba, 16 de dezembro de 2019.

Prof. Dr. Daniel Fernando Pereira Vasconcelos
 (Coordenador da CEUA/CMRV-UFPI)