

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANALGÉSICAS E
ANTIINFLAMATÓRIAS DE UMA FRAÇÃO RICA EM
POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS OBTIDA DA ACEROLA (*Malpighia
emarginata*) EM CAMUNDONGOS.**

Paula Giovanna Ciapparini

Curitiba

2018

Paula Giovanna Ciapparini

**ESTUDO DAS PROPRIEDADES ANALGÉSICAS E
ANTIINFLAMATÓRIAS DE UMA FRAÇÃO RICA EM
POLISSACARÍDEOS PÉCTICOS OBTIDA DA ACEROLA (*Malpighia
emarginata*) EM CAMUNDONGOS.**

**Monografia apresentada à disciplina BIO-028
Estágio Supervisionado em Biologia, como
pré-requisito à conclusão do Curso de
Bacharelado em Ciências Biológicas, Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná**

**Orientadora: Prof^a Dra^a Maria Fernanda de
Paula Werner**

**Co-orientador: Jorge Luiz Dallazen
(Mestrando em Farmacologia)**

Curitiba

2018

AGRADECIMENTOS

Durante a realização deste trabalho eu pude contar com a ajuda e presença de pessoas muito especiais, que sem dúvida nenhuma, contribuíram para que hoje este trabalho e este ciclo esteja finalizado. Todo meu crescimento e amadurecimento que tive nesse período, eu dedico a vocês.

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me dado suporte físico e emocional para a realização deste trabalho; aos meus pais Paulo e Silvana por sempre me auxiliarem, ajudarem e incentivarem mesmo nos momentos mais difíceis; ao meu namorado Gabriel, que esteve sempre ao meu lado; aos meus familiares, especialmente aos meus primos Isadora, Ottavio e Alessandro; e aos meus amigos Carlos, Cristian, Bianca, Bruna e Isabela por todo apoio durante essa trajetória. Sem vocês a realização deste trabalho não seria a mesma.

Agradeço também minha orientadora Maria Fernanda de Paula Werner por todos os ensinamentos e bons exemplos passados a mim; ao meu co-orientador Jorge Luiz Dallazen pelo apoio, ensinamentos e paciência nos experimentos e na parte escrita; a professora Lucimara M. C. Cordeiro e ao mestrando Rafael Roberto Klosterhoff pela extração e purificação do polissacarídeo péctico da acerola; a todos os meus colegas do Laboratório de Farmacologia do Trato Gastrointestinal e da Dor, pela amizade, paciência e auxílio.

E por fim, agradeço o CNPq pela bolsa-auxílio de Iniciação Científica.

“Não existe um caminho para a felicidade. A felicidade é o caminho.”

Mahatma Gandhi

RESUMO

Malpighia emarginata, conhecida popularmente como acerola, é uma fruta nativa dos trópicos e subtropicais americanos. Rica em ácido ascórbico, carotenoides e flavonoides, seus efeitos biofuncionais incluem atividade antioxidante que previnem diversas doenças pela inibição da oxidação por sequestro de radicais livres. Devido a suas características antioxidantes, este trabalho teve como objetivo avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do pré-tratamento com um polissacarídeo péctico extraído da acerola (ACWS), administrado pela via intraperitoneal em camundongos. Os experimentos realizados tiveram aprovação do Comitê de Ética para o uso de Animais (CEUA/BIO – UFPR: 1104). Os primeiros experimentos realizados foram o teste da formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético. No teste da formalina, em sua fase inflamatória, houve uma redução significativa da nocicepção do grupo pré-tratado com ACWS quando comparado ao grupo veículo. Na nocicepção induzida por ácido acético houve também uma diminuição significativa no número de contorções abdominais e de leucócitos peritoneais nos animais que receberam o ACWS. Em ambos os testes a dose efetiva foi a de 10 mg/kg, sendo ela escolhida para prosseguir os experimentos. Na inflamação induzida pela administração intraplantar de carragenina, o pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) foi capaz de bloquear a alodinia mecânica da 3ª a 6ª h de avaliação e diminuir significativamente o edema de pata nas da 4ª a 6ª h, quando comparados ao grupo veículo. O experimento da carragenina foi repetido para excisão das patas na 4ª hora (pico da resposta inflamatória) para realização de análises de fatores antioxidantes e inflamatórios. Visando os parâmetros antioxidantes, observou-se que o ACWS foi capaz de aumentar enzimas antioxidantes como SOD e CAT, reestabelecer os valores de GSH e diminuir a lipoperoxidação. Além disso, o ACWS apresentou efeito antioxidante no ensaio do DPPH *in vitro*. Já na determinação do seu potencial anti-inflamatório, o composto diminuiu a infiltração celular, através da redução da atividade da enzima MPO e redução nos níveis de mediadores inflamatórios, como o TNF- α . A IL- β não foi reduzida significativamente quando comparado ao grupo veículo. Portanto, o presente trabalho demonstrou que a administração do ACWS na dose de 10 mg/kg pela via intraperitoneal apresentou efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antioxidante, avaliados em diferentes modelos experimentais de dor. Estes resultados preliminares são de grande importância, pois revelam propriedades terapêuticas adicionais da pectina rica em arabinana, evidenciando o potencial benéfico da acerola para saúde.

Palavras-chave: *Malpighia emarginata*; acerola; dor; inflamação; estresse oxidativo; polissacarídeos

ABSTRACT

Malpighia emarginata, popularly known as “acerola”, is a native fruit from american tropics and subtropics. Rich in ascorbic acid, carotenoids and flavonoids, its biofunctional effects include antioxidant activity that prevents many diseases through inhibition of oxidation and scavenging of free radicals. Due to its antioxidant properties, our aim was to investigate the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the pretreatment with a pectic polysaccharide extracted from acerola (ACWS), administered by intraperitoneal route in mice. All the experiments were approved by the Committee of Animal Experimentation of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR: 1104). The first experiments performed were the nociception induced by formalin and abdominal writhing induced by acetic acid. In the formalin test, only the inflammatory phase was significantly attenuated by ACWS, when compared to vehicle. In the abdominal writhing induced by acetic acid, mice pretreated with ACWS shown a significantly reduction of writhing responses and peritoneal leukocytes. In both tests, the effective dose was 10 mg/kg, being chosen to the following experiments. The inflammation induced by intraplantar injection of carrageenan was reduced by ACWS (10 mg/kg), which blocked the development of mechanical allodynia from 3 to 6 h and reduced the paw edema from 4 until 6 h after carrageenan, when compared to vehicle group. The carrageenan test was repeated and the hindpaw surface of mice were excised in the 4 h (peaked response) for analyzes of antioxidants and inflammatory parameters. Targeting antioxidants parameters, ACWS increased the activity of SOD and CAT, reestablished the GSH levels and reduced lipid peroxidation by LOOH levels determination. Furthermore, ACWS demonstrated direct *in vitro* scavenging of DPPH free radical. Concerning the anti-inflammatory parameters, ACWS decreased neutrophil paw infiltration by reducing MPO and cytokines levels, such as TNF- α . However, IL-1 β levels were not significantly reduced when compared to vehicle group. Therefore, the present study demonstrated that the intraperitoneal pretreatment with ACWS 10 mg/kg present antinociceptive, anti-inflammatory and antioxidant effects when evaluated in different pain models. These preliminary results are of great importance for adding further therapeutic properties for this polysaccharide, characterized as arabinan-rich pectin, reinforcing the beneficial potential of acerola for health.

Keywords: *Malpighia emarginata*; acerola; nociception; anti-inflammatory; oxidative stress; polysaccharides

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. OBJETIVOS	11
3. JUSTIFICATIVA	12
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	13
4.1 DOR E NOCICEPÇÃO	13
4.2 DOR INFLAMATÓRIA	17
4.3 PRODUTOS NATURAIS E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS – <i>Malpighia emarginata</i>	18
5. MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1 MATERIAL	21
5.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ACEROLA	21
5.3 ANIMAIS	21
5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO PELA VIA INTRAPERITONIAL COM O POLISSACARÍDEO DA ACEROLA ACWS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR	22
5.4.1 Nocicepção induzida por formalina	22
5.4.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético e contagem de leucócitos peritoneais	22
5.4.3 Alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina	23
5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS	24
5.5.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA	24
5.5.2 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)	24
5.5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOPERÓXIDOS (LOOH)	25
5.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)	25
5.5.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT) ...	26

5.5.6 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO)	26
5.5.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α).....	27
5.5.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β)	27
5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
6. RESULTADOS	29
6.1 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a nocicepção induzida por formalina	29
6.2 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético e migração de leucócitos peritoneais	30
6.3 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina	31
6.4 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de glutathione (GSH)	32
6.5 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da LOOH	32
6.6 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).	33
6.7 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da atividade enzimática catalase (CAT)	34
6.8 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO).....	35
6.9 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de TNF- α	36
6.10 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de IL-1 β	37
6.11 Determinação do padrão antioxidante do composto ACWS através do sequestro do radical livre DPPH.....	38
7. DISCUSSÃO	39
8. CONCLUSÃO	45
9. REFERÊNCIAS	46

10. APÊNDICE 1 – COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/BIO) ...52

1. INTRODUÇÃO

Desde os primórdios, a humanidade procura na natureza a matéria prima para suas necessidades básicas, como roupas, meios de transporte, fertilizantes, aromas, fragrâncias, e extratos medicinais para a cura de enfermidades. As plantas vêm tendo papel importante no desenvolvimento da medicina por anos; a busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas provavelmente foi uma das primeiras formas de utilização das plantas buscando benefícios medicinais (DAVID *et al.*, 1999; VIEGAS *et al.*, 2006).

Os primeiro registros, escritos em argila, são da Mesopotâmia e datam cerca de 2600 aC; aproximadamente 1000 substâncias derivadas de plantas foram descritas, entre elas óleos das espécies de *Cedrus* (cedro) e *Cupressus sempervirens* (cipreste), *Glycyrrhiza glabra* (alcaçuz), *Commiphora* (mirra) e *Papaver somniferum* (suco da papoula) . Sendo eles ainda usados atualmente contra diversas enfermidades, como infecções e inflamações (DAVID *et al.*, 1999).

Em 1618, no Reino Unido, diversos trabalhos acerca do uso de plantas medicinais foram apresentados formalmente através da “Farmacopéia de Londres”, e assim surgiu a ideia de compostos ‘puros’, onde o princípio ativo de cada planta era isolado – como nos casos da estricnina, morfina, atropina e colchicina, que foram isolados em meados dos anos 1800. Esses isolamentos foram seguidos pela comercialização de produtos naturais isolados, como a morfina por E. Merck, em 1826 e dos semi-sintéticos baseados em produtos naturais, como a aspirina, em 1899 pela Bayer (DAVID *et al.*, 1999).

Já em 1990, aproximadamente 80% das drogas tinham como origem produtos naturais, ou eram análogos a eles. Antibióticos (penicilina), antiparasitários (ivermectina), imunossupressores para órgãos transplantados (ciclosporina) e drogas anticâncer (taxol), revolucionaram a medicina. A expectativa de vida mundial que era de 40 anos no século XX, hoje ultrapassa os 77 anos (JESSE *et al.*, 2009).

O Brasil é privilegiado em termos de biodiversidade, já que aproximadamente 20% do número total de espécies do planeta se encontram aqui. Esse imenso patrimônio genético faz do Brasil uma potência no desenvolvimento de novos medicamentos, obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais (CALIXTO, 2003).

Acredita-se que a dor foi uma das primeiras patologias tratada com medicamentos desenvolvidos a partir de plantas, ou baseadas em seus princípios ativos (DUTRA *et al.*

216). Na antiguidade, as doenças dolorosas ou causadas por objetos eram atribuídas à fluídos mágicos, demônios e espíritos, e seu tratamento baseava-se na retirada do objeto que poderia estar causando a dor, ou no uso de amuletos, feitiçarias para se proteger contra os demônios que causavam dor (TAINTER, 1948).

Como as plantas têm uma vasta aplicação em diversas patologias, há um interesse em investigar seus efeitos analgésicos, visto que a maioria dos fármacos disponíveis no mercado possuem baixa eficácia ou efeitos adversos expressivos. Com isso, há um grande interesse dos pesquisadores nas descobertas de novos fármacos provenientes de plantas da flora brasileira (JULIANE *et al.*, 2013).

2. OBJETIVOS

Investigar o efeito analgésico e anti-inflamatório de uma fração de polissacarídeos (pectinas ricas em arabinanas) extraído da acerola (*Malpighia emarginata*) administrado pela via intraperitoneal em diferentes modelos experimentais de nocicepção química e inflamatória.

3. JUSTIFICATIVA

Devido à sua enorme quantidade de vitamina C e seu potencial antioxidante, a acerola possui efeitos já observados contra doenças relacionadas com a idade, como cânceres, hipertensão, arteriosclerose e infarto do miocárdio, inibindo a oxidação por sequestro dos radicais livres. Pesquisadores já identificaram a eficácia de seus extratos contra atividade de células escamosas de carcinoma humano, anti-HIV, além de atividade antibacteriana e antifúngica (MOTOHASHI *et al.*, 2004). DIAS *et al.* (2014) demonstraram a atividade anti-inflamatória do suco da acerola, através da redução dos níveis de citocinas inflamatórias (TNF- α) e aumento de citocinas anti-inflamatórias (IL-10) em um modelo de obesidade. Além disso, KLOSTERHOFF *et al.* (2017) e KLOSTERHOFF *et al.* (2018) demonstraram o efeito anti-fadiga e antioxidante *in vitro* e *in vivo* de um polissacarídeo péctico isolado da acerola. Dessa maneira, pretendemos verificar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva deste polissacarídeo isolado da acerola em modelos experimentais em camundongos.

4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 DOR E NOCICEPÇÃO

Assim como a beleza não é inerente à uma imagem visual, a dor é uma experiência complexa que envolve não somente a transdução de um estímulo nocivo do meio, mas também estímulos cognitivos e emocionais, que são processados pelo cérebro (JULIUS *et al.*, 2001). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), a dor pode ser definida como “uma experiência somática, mutualmente reconhecível que reflete a percepção de uma pessoa às ameaças à sua integridade corporal e/ou existencial”. Essa definição integra a subjetividade ou a experiência da dor pela pessoa que a sente, com o desafio da segunda pessoa (como profissionais da saúde), de reconhecer e intervir na dor (IASP, 2018).

A dor pode ser classificada levando em consideração a sua duração (aguda, subcrônica, crônica), fisiopatologia (fisiológica, nociceptiva, neuropática), e contexto clínico (pós-cirúrgica, malignidade, neuropática, degenerativa) (SINATRA *et al.*, 2009).

A percepção da dor ocorre quando estímulos mecânicos, químicos, biológicos ou térmicos, ativam um potencial que excede o limiar de ativação, transformando esses estímulos em estímulos elétricos, que são transmitidos através de células nervosas especializadas chamadas nociceptores, de áreas periféricas até a medula espinhal, ascendendo para as áreas centrais do cérebro (RANG e DALE, 2012; ZEILHOFER, 2005). Os nociceptores são neurônios sensoriais periféricos especializados, mielinizados ou não, presentes em diversos tecidos como, pele, juntas, tratos respiratórios e gastrointestinal, que convertem (transduzem) uma variedade de estímulos em impulsos nervosos que o cérebro interpreta para produzir a sensação de dor (DUBIN, 2010; LOESER e MELZACK, 1999; PINHO-RIBEIRO *et al.*, 2017). Essa transdução de sinal é a conversão de um estímulo em sinal elétrico, gerando o potencial de ação na fibra, que pode ocorrer a partir de mediadores inflamatórios ou mudanças neurais; a percepção da dor é frequentemente desencadeada por um estímulo nocivo, como uma lesão ou uma doença. O sofrimento é uma resposta negativa induzida pela dor, ou por fatores como medo, ansiedade, estresse e outros estados psicológicos, e os comportamentos relacionados à dor são o resultado da soma da dor ao sofrimento, que faz com que o indivíduo procure alternativas para aliviar as respostas negativas causadas pelo estímulo (LOESER e MELZACK, 1999).

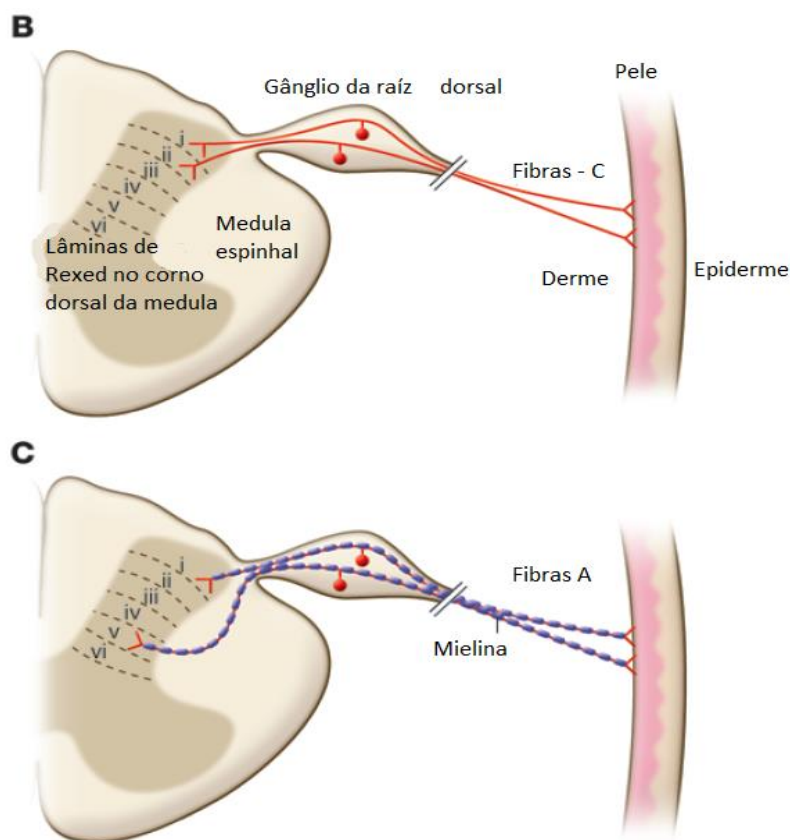
Sob condições normais, a dor associa-se à atividade de impulsos em fibras aferentes primárias (C e A δ) que se classificam com base na velocidade de transmissão do impulso, na sensibilidade e limiar de ativação frente à estímulos (DUBIN, 2010). A maioria dos neurônios de fibras não mielinizadas (C) é associada às terminações nociceptivas polimodais que transmitem dor profunda, difusa e em queimação, e possuem um diâmetro menor; enquanto as fibras mielinizadas (A delta) transmitem dor aguda e bem localizada, e possuem um diâmetro maior (FEIN, 2011; RANG E DALE, 7ª edição). O neurônio de primeira ordem, localizado na periferia (nociceptor aferente primário) projeta-se para o corno dorsal da medula espinhal, onde faz sinapse com um neurônio nociceptivo de segunda ordem, que ascende para o cérebro, no qual faz sinapse com o neurônio de terceira ordem nas regiões do tálamo, sistema límbico (centro emocional) e córtex, onde o estímulo doloroso será interpretado e reconhecido (HELMS; BARONE, 2008).

A alteração da permeabilidade iônica que ocorre na membrana plasmática dos nociceptores é a responsável pelo influxo maior de íons pelos seus canais, dando origem ao potencial sináptico que despolarizará o neurônio, conduzindo o sinal doloroso até o corno dorsal da medula (transdução). Essa despolarização se deve à um influxo de íons como Na⁺, Ca⁺² e Cl⁻ para dentro da célula, e um efluxo de íons K⁺ (DUBIN, 2010). Diversos canais são implicados na transdução do sinal doloroso, entre eles estão a família dos canais de cátions do receptor de potencial transitório (TRP), sendo que a característica polimodal dos nociceptores se deve as particularidades de cada receptor, podendo uma mesma fibra ser despolarizada por diferentes estímulos (FEIN,2011; TRACEY, 2017).

Expressos nas fibras nociceptivas, os TRPs podem ser ativados termicamente, mecanicamente e quimicamente. O primeiro TRP descoberto foi o TRPV1, conhecido como receptor da capsaicina (ingrediente picante presente na pimenta), ele é ativado não somente pela capsaicina, mas também por outros estímulos térmicos; após ele, foram descobertos também os canais TRPV2, TRPV3 e TRPV4, que possuem limiar de ativação em temperaturas nocivas. Outros receptores sensíveis a temperaturas nocivas que não fazem parte da família dos TRP, são os canais permeáveis ao cloro TMEM16A/anocetamina e os canais de dois poros de potássio, TREK1, TREK2 e TRAK. Os receptores TRAK e canais de K_{v1.1} também modulam da nocicepção de estímulos mecânicos juntamente com as proteínas-canais transmembranas (TMC). Já os TRPA1 são ativados com estímulos químicos. (FEIN,2011; TRACEY, 2017; SCHOLZ *et al.*, 2002).

Após a transdução, o estímulo nociceptivo é transmitido para modulação central. A sinapse com o neurônio de segunda ordem ocorre na superfície do corno dorsal da medula espinhal, com a liberação de diversas substâncias das suas terminações centrais; são elas, glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (DUBIN, 2010). O glutamato tem como alvo os receptores AMPA – em resposta a estímulos nocivos sem danos decíduais – e receptores NMDA – em resposta a estímulos muito intensos ou repetitivos, associados a dano tecidual. A ativação desses receptores produz uma sequência de eventos que aumentam a excitabilidade dos neurônios presentes no corno dorsal da medula (KIDD, B. L.; URBAN, L. A., 2001). O corno dorsal da medula espinhal, local onde ocorre a primeira sinapse, é dividida em 10 diferentes lâminas (I – X) de acordo com Rexed. As fibras C terminam em sua maioria nas lâminas I e II, as fibras A δ nas lâminas I e V e as fibras A β (propriocepção) nas lâminas III, IV e V (FIGURA 1).

FIGURA 1 – Corno dorsal da medula e suas lâminas onde ocorre a sinapse do nociceptor primário com secundário.



FONTE: Adaptado de Dubin, 2010.

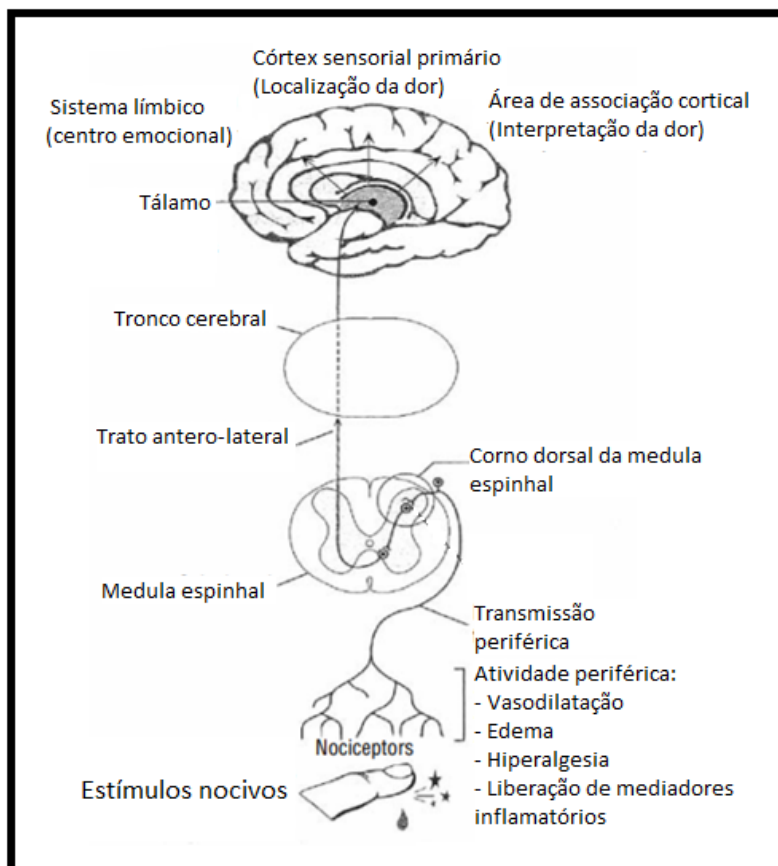
Como dito anteriormente, o estímulo ascende então para o cérebro nas regiões do tálamo, sistema límbico e córtex onde o estímulo doloroso será interpretado (HELMS; BARONE, 2008).

A dor não deve ser confundida com nocicepção, já que uma pode ocorrer sem a outra. O termo nocicepção refere-se ao processo sensorial desencadeado, e dor refere-se à percepção de um sentimento ou sensação que a pessoa designa como dor e descreve-a como irritativa, dolorosa, desagradável (RANG e DALE, 7ª edição; LOESER e TREEDE, 2008; KOPF, 2010).

Dentre os tipos de dor temos a dor aguda, que é bem explicada em termos de nocicepção: ocorre quando um estímulo nociceptivo excessivo gera uma sensação intensa e desagradável. Em situações inflamatórias ou de lesão ou disfunção do sistema somatossensorial, a dor dá origem a estados chamados de hiperalgesia e alodinia. O primeiro envolve a sensibilização das terminações nervosas nociceptivas periféricas e facilitação central da transmissão do sinal nervoso, e é a resposta de dor frente à um estímulo normalmente doloroso; o segundo é a dor provocada em resposta à um estímulo inócuo, ou seja, que não causa dor. (RANG e DALE, 7ª edição; LOESER e TREEDE, 2008; KOPF, 2010).

Embora a dor aguda seja tipicamente decorrente da ativação direta de nociceptores, neurônios que são ativados com toque leve podem ser ativados juntamente com os nociceptores, causando dor após a lesão. Como mencionado anteriormente, essa condição patológica é denominada de alodinia mecânica e ainda não há conhecimento sobre qual neurônio mecanosensor está envolvido no processo. Contudo, sabe-se que mudanças nos circuitos do corno dorsal da medula contribuem para seu aparecimento. Uma das teorias que explicam essas mudanças é a teoria de portão do controle da dor, onde há uma inibição do estímulo doloroso por meio da ativação de interneurônios inibitórios na camada superficial do corno dorsal. No caso da alodínia mecânica, a lesão tecidual desativa esses interneurônios inibitórios, fazendo com que até estímulos inócuos desencadeiem a cascata nociceptiva. Esses interneurônios inibitórios são fundamentais para prevenir a ativação de fibras de baixo limiar em situações fisiológicas normais (PEIRS, C.; SEAL, P. R., 2016).

FIGURA 2 – Representação esquemática da transdução do sinal doloroso pelos nociceptores da periferia até o cérebro.



FONTE: Adaptado de Helms; Barone, 2008.

4.2 DOR INFLAMATÓRIA

Clinicamente, a inflamação é caracterizada por 5 sinais: rubor, calor, edema, dor e perda de função. O processo inflamatório ocorre como uma resposta protetora do organismo frente a uma agressão, envolvendo células imunes, vasos sanguíneos e mediadores moleculares (JI, RU-RONG; 2016). Os estímulos agressores podem ser oriundos de agentes físicos (cortes, contusões, queimaduras), químicos (substância caustica) e biológicos (infecções em geral) (CARVALHO, 1998). A função da inflamação é eliminar a causa inicial que danificou a célula, e iniciar o processo de reparo do tecido; esse processo induz a liberação de mediadores inflamatórios por células imunes, que levam à um grande aglomerado de citocinas, fatores de crescimento, purinas e aminas no tecido. Muitos desses mediadores inflamatórios são responsáveis pela ativação direta

dos nociceptores, desencadeando a dor; outros apenas sensibilizam o sistema somatossensorial diminuindo o limiar de ativação dos nociceptores, característica recorrente na dor inflamatória. Dentre eles estão a bradicinina, interleucinas IL-1, IL-6 e IL-8 e TNF- α (fator de necrose tumoral), que causam inflamação e hiperalgesia pela sensibilização dos nociceptores via receptores associados a quinases e fosforilação de canais iônicos. Ademais, prostaglandinas contribuem com a sensibilização dos nociceptores pelo aumento de AMPc intracelular, reduzindo seu limiar de ativação por canais de sódio TTX-R via proteína quinase e em alguns casos ativando-os diretamente para causar dor (KIDD, B. L; URBAN, L. A., 2001).

Além disso, o aumento da expressão da enzima cicloxigenase-2 (COX-2) leva a liberação de prostanóides que também sensibilizam nociceptores periféricos e causam dor inflamatória. A produção de prostanóides requer a conversão dos fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico, via enzima fosfolipase A₂, e a conversão do ácido araquidônico em prostanóides, via COX-2 (JI, RU-RONG, 2016; SAMAD et al., 2001).

Os anti-inflamatórios não esteroidais são os mais utilizados para conter os processos inflamatórios, já que inibem seletivamente, ou não, a enzima COX. Existem dois tipos de COX: a COX-1, que é constitutiva e está presente em quase todas as células; e a COX-2 que tem sua expressão aumentada apenas em processos inflamatórios. Os prostanóides contribuem para o aumento da sensibilização periférica através da fosforilação de canais de sódio nos terminais dos nociceptores, aumento da sua excitabilidade e diminuição do limiar de ativação dos nociceptores (SAMAD et al., 2001). A hiperalgesia é uma característica essencial da dor inflamatória, que conta com a ação de mediadores inflamatórios como: prostaglandinas, bradicinina, histamina, que induzem a vasodilatação; e o dano tecidual e metabolismo anormal que levam a redução do pH, podendo ativar os nociceptores devido ao aumento de prótons (HUNSKAAR, 1987; ZHANG; DENG, 2017; ZHANG et al., 2017).

4.3 PRODUTOS NATURAIS E SEUS EFEITOS BIOLÓGICOS – *Malpighia emarginata*

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A natureza sempre despertou interesse ao homem, não só como forma de alimentação, mas por ser sua principal fonte

de inspiração e aprendizado, e ajudar a vencer as barreiras da sobrevivência, como o clima e as doenças. (VIEGAS et al., 2006)

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais, os quais determinaram várias disputas de posse da nova terra e a colonização pelos portugueses. A profunda utilização do arsenal químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas, pode ser considerado fator fundamental para descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. (VIEGAS et al., 2006)

Compondo uma importante parte dentro dos produtos naturais, as frutas são ricas em nutrientes necessários para a dieta humana bem como em princípios ativos medicinais. Contendo grandes quantidades de carboidratos, vitaminas, minerais e ácidos orgânicos, as dietas ricas em frutas e vegetais reduzem o risco de doenças crônicas e alguns tipos de câncer (ASSIS et al., 2007; MOTOHASHI et al., 2004;).

Malpighia emarginata, mais conhecida como acerola – uma fruta produzida por uma árvore pequena – pertence ao gênero *Malpighia*, que compreende 30 espécies de arbustos e árvores pequenas, nativas dos trópicos e subtropicais americanos. Também conhecida como *barbados cherry*, a acerola é uma drupácea, carnosa, podendo variar o tamanho de 1 a 4 cm e o peso de 2 a 15 gramas, de cor verde quando em desenvolvimento e vermelha quando madura, cuja forma varia de redondo à cônico. Ela é rica em ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e flavonóides. A vitamina C produzida pela acerola é melhor absorvida pelo organismo humano quando comparado ao composto sintético, visto que apenas 50% desse é absorvido. UCHIDA *et al.* (2011) observaram que a maior absorção da vitamina C proveniente da acerola, se deve a presença de polifenóis glicosilados no carbono 3; esses polifenóis estão presentes na nossa dieta e quando não glicosilados, inibem o transportador de ácido ascórbico, dificultando sua absorção; porém quando glicosilados no carbono 3, como ocorre na acerola, essa propriedade inibitória se perde, fazendo com que o transporte da vitamina seja mais eficiente e ela seja melhor absorvida. Os efeitos biofuncionais da acerola incluem atividade antioxidante que previne doenças relacionadas com a idade, como cânceres, hipertensão, arterosclerose e infarto do miocárdio, inibindo a oxidação por sequestro dos radicais livres (ASSIS et al., 2007; MOTOHASHI et al., 2004; SCHRECKINGER et al., 2010; LEFFA, et al., 2016).

Seu uso popular é indicado em casos de carência de vitamina C, desinterias, estados febris, excesso de ácido úrico, gripes, retenção de líquidos, e outras doenças infecciosas. Os frutos maduros são consumidos ao natural ou na forma de suco, refresco e sorvete (LORENZI, 2002; GARCEZ, 2001). De acordo com pesquisadores, frações já

estudadas da acerola, obtiveram resultados positivos contra atividade de células escamosas de carcinoma humano, anti-HIV, atividade antibacteriana contra as bactérias *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e ação antifúngica contra *Candida albicans* (MOTOHASHI et al., 2004). Além disso, a atividade antiinflamatória da acerola também já foi documentada; seus extratos mostraram inibição na produção de óxido nítrico nos macrófagos de camundongos, por inibição da expressão da enzima óxido nítrico sintase (SCHRECKINGER et al., 2010).

O metabolismo é definido como o conjunto de todas as transformações das moléculas orgânicas, catalisadas por enzimas, que ocorrem nas células vivas, fornecendo energia e garantindo o bom funcionamento do organismo. Essas reações estabelecem rotas metabólicas devido à presença de enzimas específicas, visando sempre o aproveitamento de nutrientes para satisfazer as exigências fundamentais da célula. Essas rotas compõem o metabolismo primário e secundário. O primário é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e várias substâncias necessárias para a realização das funções vitais (metabólitos primários); já o secundário, que compreende os metabólitos secundários, geralmente possuem estrutura complexa, baixo peso molecular e se encontram em baixas concentrações nas plantas (diferente do que ocorre com os metabólitos primários) (PEREIRA E CARDOSO, 2012). Os polissacarídeos, um dos compostos primários produzidos pelas plantas, tem ganhado destaque e são frequentemente estudados quanto à sua atividade biológica, seu grande espectro terapêutico e toxicidade relativamente baixa; Diversos trabalhos comprovaram os efeitos antiinflamatório e antinociceptivo (NASCIMENTO, et al., 2014; RUTHES, et al., 2013), gastroprotetor (CANTU-JUNGLES et al., 2014; CORDEIRO et al., 2012) e anticoagulante (OCHOA et al., 2017; SANTANA et al., 2016) de polissacarídeos obtidos de produtos naturais.

A pectina é uma família de polissacarídeos com função de hidratar e sustentar a rede de celulose das plantas. Apesar de ocorrer na maioria da parede celular das plantas, ela é encontrada majoritariamente em frutas cítricas, como a acerola. Sua estrutura química é composta principalmente de unidades repetidas de ácido galacturônico unidas por uma ligação glicosídica $\alpha 1 \rightarrow 4$, formando um polímero linear; essa estrutura varia de fruta para fruta e dos diferentes estágios de desenvolvimento da fruta. Diversos trabalhos também já demonstraram o efeito terapêutico de pectinas de diversas frutas (CHEN et al., 2006; POPOV et al., 2014).

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIAL

Os frutos maduros da acerola foram comprados em um mercado local em Curitiba, Paraná, Brasil. As sementes foram removidas manualmente e a polpa, juntamente com a casca, foram liofilizadas e moídas (48 g).

5.2 EXTRAÇÃO E PURIFICAÇÃO DOS POLISSACARÍDEOS DA ACEROLA

Os compostos não polares da polpa foram extraídos utilizando como solvente clorofórmio-metanol (1:1), com o auxílio do aparelho Soxhlet. Os polissacarídeos foram extraídos do resíduo com água fervente sob refluxo durante 2 horas. Os extratos aquosos foram combinados e concentrados sob pressão reduzida, e os polissacarídeos foram precipitados com etanol e liofilizados, resultando na fração ACW. Esta fração foi submetida a um processo de congelamento e descongelamento, centrifugada e deu origem as frações solúveis em água fria (ACWS) e insolúvel (ACWP). A fração ACWS representa 93% do total de carboidratos e foi isolada, purificada e caracterizada como um polissacarídeo péctico rico em arabinana, obtido das frutas de acerola, pelo grupo de pesquisa da Prof^a. Dr^a. Lucimara M. C. Cordeiro e pelo mestre Rafael Roberto Klosterhoff, do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal do Paraná.

5.3 ANIMAIS

Neste trabalho foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*) adultos, com peso de 25 a 30 g. Os animais foram fornecidos pelo Biotério do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (UFPR), e mantidos em ciclo claro-escuro de 12 horas, com temperatura controlada (22 ± 2 °C), exaustão de ar e acesso livre à água e ração comercial (Nuvilab CR-1, Quimtia S/A, Brasil). O projeto foi avaliado e os experimentos foram realizados somente após aprovação do Comitê de Ética

para o Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), sob número 1104.

5.4 EFEITOS DO TRATAMENTO PELA VIA INTRAPERITONIAL COM O POLISSACARÍDEO DA ACEROLA ACWS EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR

5.4.1 Nocicepção induzida por formalina

Os animais foram tratados por via intraperitoneal com veículo (salina, 10 ml/kg), ACWS (0,1; 1 e 10 mg/kg) ou diclofenaco (50 mg/kg), 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina 2,5% (20 µl) na superfície ventral da pata traseira direita. Os animais foram colocados individualmente em funis de vidro e o tempo em que permaneceram lambendo a pata (segundos, s), foi considerado como indicativo de nocicepção. O tempo de lambida foi avaliado de 0 - 5 minutos (fase neurogênica) e de 15 - 30 minutos (fase inflamatória) (RODRIGUES et al., 2012).

5.4.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético e contagem de leucócitos peritoneais

Os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com veículo (salina, 10 ml/kg), ACWS (1, 10 e 30 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg), 30 minutos antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6 % (450 µl/camundongo). As contrações abdominais foram contadas cumulativamente durante 20 minutos. Ao término do experimento, os animais foram eutanasiados e tiveram sua cavidade peritoneal lavada com 1 ml de salina heparinizada (25 IU/ml). O total de células (leucócitos) foram contadas com auxílio da câmara de Neubauer (MARCON et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2014).

5.4.3 Alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina

A carragenina, quando administrada pela via intraplantar, é responsável por induzir uma resposta inflamatória aguda revelada por edema e sensibilidade à estímulos não nocivos (alodinia). Para isso, os animais foram pré-tratados intraperitonealmente com veículo (salina 0,9%, 20 µl), ACWS (10 mg/kg) ou dexametasona (1 mg/kg), 30 minutos antes da injeção intraplantar de carragenina (300 µg/ 20 µl) (WINTER et al., 1962).

Para avaliar a alodinia mecânica, os camundongos foram colocados em uma plataforma elevada com uma tela metálica que permitiu o acesso a superfície plantar das patas traseiras. A alodinia mecânica foi determinada através da resposta dos camundongos às aplicações dos filamentos de Von Frey (0,04 - 4 g) de acordo com o método *up-and-down* de Dixon (1980), modificado por Chaplan et al. (1994), que consiste em determinar 50% do limiar de retirada da pata. Inicialmente, para determinar o filamento de partida para começo dos estímulos, os animais foram ambientados durante 1 hora, e posteriormente foram realizados os estímulos nas patas posteriores direita com os filamentos de von Frey durante 5 segundos. Partindo deste filamento (0,6 g), foi realizada sua aplicação por 5 segundos. Na ausência de resposta, ela foi considerada negativa, e avaliamos a resposta do animal frente ao mesmo estímulo, porém com um filamento mais calibroso. Se a resposta passou a ser positiva (houve retirada da pata), aplicamos um filamento menos calibroso. O intervalo entre um estímulo e outro foi de 30 segundos, passando-se para o próximo animal quando se observou resposta positiva. O possível efeito anti-alodínico do polissacarídeo foi avaliado em diferentes intervalos de tempo após a administração da carragenina (1 a 6 horas).

O edema foi mensurado através da medição da espessura da pata injetada com o auxílio de um micrômetro digital. Foram medidos inicialmente os valores basais – antes da injeção de carragenina – e após, em diferentes intervalos de tempo após a administração da carragenina (1 a 6 horas).

Este experimento foi repetido para que no pico de efeito terapêutico do ACWS, as superfícies plantares das patas fossem excisionadas para análise da infiltração de leucócitos através da determinação indireta da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), análise do efeito antioxidante através dos níveis de glutathiona reduzida (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e lipoperóxidos (LPO), bem como citocinas pró-inflamatórias: interleucina-1β (IL-1β) e fator de necrose tumoral-α (TNF- α).

5.5 DETERMINAÇÃO DE PARÂMETROS ANTIOXIDANTES E ANTI-INFLAMATÓRIOS

Como mencionado anteriormente, o experimento de inflamação aguda induzido por carragenina foi repetido com a finalidade de coletar as superfícies plantares no intervalo entre a 3^a e 4^a hora (pico de efeito do ACWS), para a dosagem de parâmetros inflamatórios e antioxidantes.

As amostras de pata foram homogeneizadas em tampão fosfato 200 mM (pH 6,5) a 4 °C e o homogenato foi utilizado para determinação de GSH e LOOH. Após centrifugação, o sobrenadante foi transferido para outro tubo com o intuito de determinar a atividade enzimática da SOD e CAT. O pellet foi utilizado para determinação da atividade da MPO.

5.5.1 DOSAGEM DE PROTEÍNA

A concentração de proteínas nas amostras foi determinada pelo método de Bradford (Bio-Rad®, Hercules, CA, USA), utilizando albumina de soro bovino (BSA) como padrão, realizada de acordo com as instruções do fabricante, com leitura em espectrofotômetro 540- 590 nM.

5.5.2 DOSAGEM DE GLUTATIONA REDUZIDA (GSH)

A glutatona (GSH) é um tiol intracelular biologicamente importante; a depleção dos seus níveis pode ser utilizada para avaliar a exposição das células ao estresse oxidativo. O GSH desempenha um papel importante na neutralização de radicais livres, protege as células contra várias espécies químicas tóxicas derivadas de oxigênio, é uma co-enzima importante para a atividade da glutatona peroxidase e protege também, grupos sulfidrilas contra a ação de proteínas da oxidação (AFZAL, 2002). Devido ao potencial antioxidante da acerola (LEFFA, et al., 2016), fazer a quantificação do GSH ajudou a comprovar essa importante característica da fruta.

O método para a determinação dos níveis de GSH presentes na superfície plantar das patas retiradas dos animais foi realizado com base nos métodos de Sedlak e Lindsay,

1998. O tecido da pata foi homogeneizado em 2 ml de tampão Tris-HCL 50 mM, contendo 20 mM de EDTA e 0,2 M de sacarose, pH 7,5. O homogenato foi centrifugado a 4200 rpm por 40 minutos a 4 °C, e o sobrenadante foi usado para determinar o GSH usando DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzóico) 1 Mm. A leitura foi feita, então, através de um espectrofotômetro a 412nm.

5.5.3 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE LIPOPERÓXIDOS (LOOH)

A lipoperoxidação é uma cascata de eventos bioquímicos que ocorre a partir da ação de radicais livres sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares, formando lipoperóxidos. Os lipoperóxidos levam a destruição da estrutura da membrana celular, falência dos mecanismos de troca de metabólitos e até morte celular, em casos extremos. O método utilizado para a quantificação dos níveis de LOOH foi o descrito por JIANG *et. al.*, 1992, e é chamado de método de FOX. Ele é baseado na oxidação de Fe^{2+} (sulfato de amônio ferroso) em Fe^{3+} por hidroperóxido, em meio ácido, na presença de um complexo de óxidos de ferro III de alaranjado de xilenol. As amostras foram homogeneizadas em metanol 90% (1:1), pH 6,5, e centrifugado a 14000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Para a reação, 40 µl da amostra foi incubada por 30 minutos em temperatura ambiente com 260 µl do meio reacional (1 ml de alaranjado de xilenol, 250 µM de $FeSO_4$, 25 mM H_2SO_4 e 4 mM de BHT em 90% de metanol). As leituras foram feitas a 560 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mmol de hidroperóxido/mg de tecido.

5.5.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA SUPERÓXIDO DISMUTASE (SOD)

A enzima superóxido dismutase (SOD) é a primeira linha de defesa contra radicais superóxidos, que são altamente tóxicos para os organismos. Ela catalisa a dismutação do superóxido (O_2^-) em oxigênio e peróxido de hidrogênio, que é degradado posteriormente pela CAT e GSH (MELONI, 2003; SURAI, 1998). O método utilizado para a determinação da sua atividade foi o padronizado por MARKLUND e MARKLUND (1974), que se baseia na capacidade da SOD de inibir a auto-oxidação do pirogallol. Em um tubo de 2 ml foram adicionados 442,5 µl de tampão TRIS HCL-EDTA (pH 8,5; temperatura ambiente) e 20 µl

do sobrenadante da amostra. Após agitação em vortex, foram adicionados 25 µl de pirogallol (1 mM) e a solução foi incubada em temperatura ambiente por 20 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 12,5 µl de HCl (1 N). Os tubos foram centrifugados por 4 minutos a 14000 *rpm*, e pipetados 300 µl do sobrenadante em uma microplaca de 96 poços para leitura em espectrofotômetro a 405 nm. Os resultados foram expressos em U de SOD/mg de proteína.

5.5.5 QUANTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA DA CATALASE (CAT)

A catalase é uma enzima responsável pela dismutação da molécula de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) em água (H_2O) e oxigênio (O_2); ela é encontrada em grande maioria nos peroxissomos. Para a sua determinação, foi adicionado 5 µl de amostra na microplaca em 295 µl de meio reacional (peróxido de hidrogênio em tampão TRIS-EDTA). A leitura em espectrofotômetro foi realizada em 240 nM, e devido a rápida cinética da catalase, adicionou-se o meio reacional em uma linha por vez. Realizou-se 5 leituras para cada linha da microplaca. Os resultados foram expressos em densidade óptica por minutos por mg de proteína.

5.5.6 DOSAGEM DE MIELOPEROXIDASE (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima característica de processos inflamatórios. Ela está presente nos grânulos azurófilos de neutrófilos que migram para o local nas fases iniciais da inflamação. Para avaliar o possível efeito anti-inflamatório do polissacarídeo, foi empregado a dosagem da MPO, a qual avalia indiretamente a infiltração de neutrófilos na pata dos camundongos injetados com carragenina (BRADLEY et al., 1982, e modificado por DE YOUNG et al., 1989).

A superfície plantar da pata injetada foi homogeneizada com 500 µl de tampão fosfato 200 mM (pH 6,5). Após, o homogenato foi centrifugado a 8900 rpm durante 20 minutos e 30 µl do sobrenadante foi pipetado em duplicata em uma placa de 96 poços, adicionado 220 µl de uma solução reacional [100 µl de tampão fosfato 80 mM (p.H 6,5); 85 µl de tampão fosfato 22 mM (98% fosfato de sódio monobásico e 2% de fosfato de sódio dibásico, p.H 6,5); 15 µl de H_2O_2 0,017%]. A reação foi iniciada com 3,3,5,5'-

tetrametilbenzidina (TMB), incubada por 3 minutos a 37 °C, e interrompida pela adição de 30 µl de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0) em cada poço. Para medir a atividade enzimática, a placa foi lida no espectrofotômetro a 620 nm e os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O) por mg de proteína.

5.5.7 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE FATOR DE NECROSE TUMORAL- α (TNF- α)

O fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) é uma citocina derivada de macrófagos, envolvida em respostas inflamatórias e imunes (CORTI *et al.*, 1994). Ele desempenha um papel primordial na defesa do organismo contra patógenos e modula a hiperalgesia inflamatória iniciando uma cascata de outras citocinas inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e IL-8 (SINGH *et al.*, 2018). O método utilizado para detecção desta citocina foi utilizando um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com o protocolo do fabricante (PeProtech®), e o resultado foi expresso em pg/mg de proteína em cada amostra.

5.5.8 DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE INTERLEUCINA-1 β (IL-1 β)

A interleucina IL-1 β é uma molécula pró-inflamatória liberada principalmente por monócitos, macrófagos, fibroblastos e células endoteliais durante a lesão celular e inflamação. Ela também modula a excitação neuronal afetando receptores neuronais como: TRPV1, canais de sódio, receptores de GABA e NMDA (SINGH *et al.*, 2018). Os níveis de IL-1 β foram avaliados utilizando um kit de ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as recomendações do fabricante (PeProtech®), e o resultado foi expresso em pg/mg de proteína em cada amostra.

5.5.9 DETERMINAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE DO ACWS ATRAVÉS DO SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH (2,2-Difenil-1-picril-hirazil)

O DPPH é um radical livre estável usado para elucidar o potencial antioxidante de diversos compostos. Esse método foi proposto por BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995, e para tal determinação, foi realizada uma solução mãe de ACWS da qual foram obtidas frações diluídas de concentração 1, 3, 10, 30, 100, 300 e 100 µg/ml. 225 µl de cada fração foi

misturada com 75 µl de uma solução metanólica de DPPH (40 µg/ml) para determinar a capacidade da pectina de capturar o radical livre, *in vitro*. Como controle positivo foi utilizado ácido ascórbico (50 µg/ml) e como controle negativo, água destilada. Após, a absorbância foi mensurada através de um espectrofotômetro em 517 nm, e os respectivos valores foram interpolados com a curva de DPPH (0-60 µM) e expressos em µM. Todas as amostras foram determinadas em triplicata.

5.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pelo programa GraphPad Prism 6[®], versão 6.01, da GraphPad Software, USA. Os dados foram apresentados como média ± erro padrão das médias e avaliados pelo teste *t de Student* ou por análise de variância ANOVA de uma ou duas vias, seguida do teste para múltiplas comparações de Bonferroni. A CI_{50} foi analisada por regressão não-linear (curva dose-resposta sigmoidal, inclinação variável) e como média geométrica (logarítmica). Em todos os resultados, foi considerado diferença significativa quando $P < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a nocicepção induzida por formalina

O pré-tratamento pela via intraperitoneal com ACWS nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg não foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva induzida por formalina 2,5% (20 μ l, i.pl.) na primeira fase (neurogênica), quando comparado com o grupo pré-tratado com veículo (salina 0,9%) (FIGURA 3 – painel A). Com relação a segunda fase (fase inflamatória), todas as doses do ACWS reduziram a nocicepção em 44,2%, 63,3% e 88,1%, respectivamente; enquanto que o diclofenaco (controle positivo) reduziu em 69,2% (V: 266,0 \pm 34,7 s) (FIGURA 3 – painel B). Houve diferença significativa entre o efeito anti-nociceptivo promovido pelas doses de 0,1 e 10 mg/kg do ACWS.

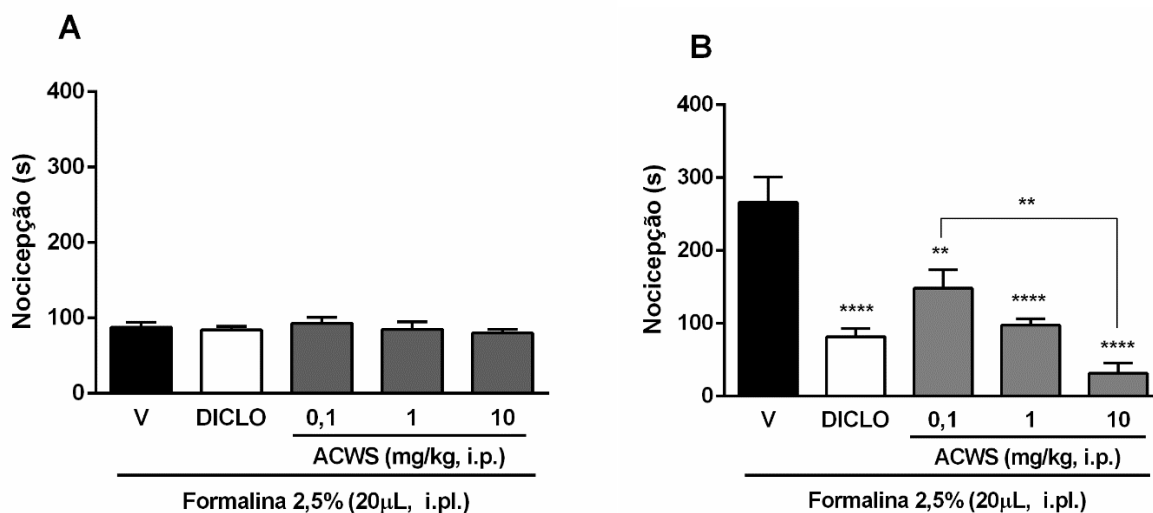


FIGURA 3 – Efeito da administração intraperitoneal do ACWS sobre a nocicepção induzida por formalina 2,5% em camundongos. A nocicepção foi avaliada na primeira fase (0-5 min – painel A) e na segunda fase (15-30 min – painel B). Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS nas doses de 0,1, 1 e 10 mg/kg e diclofenaco (DICLO: 50 mg/kg), 30 min antes da injeção intraplantar de formalina 2,5%. Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6-8). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^{**} < 0,01$; $P^{****} < 0,0001$.

6.2 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético e migração de leucócitos peritoneais

O pré-tratamento com ACWS nas doses de 10 e 30 mg/kg (i.p.) e dexametasona (1 mg/kg) reduziu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 56,57%, 78,23% e 55,0%, respectivamente, quando comparados ao grupo com veículo (V: $45,1 \pm 1,6$ contorções).

Já na contagem de leucócitos peritoneais, as doses 1, 10 e 30 mg/kg foram capazes de reduzir o número de leucócitos em 34,72%, 64,36% e 60,92%, respectivamente, e o grupo dexametasona foi capaz de reduzir em 44,0%, ambos quando comparados ao grupo controle (V: $87,0 \pm 8,2$ leucócitos).

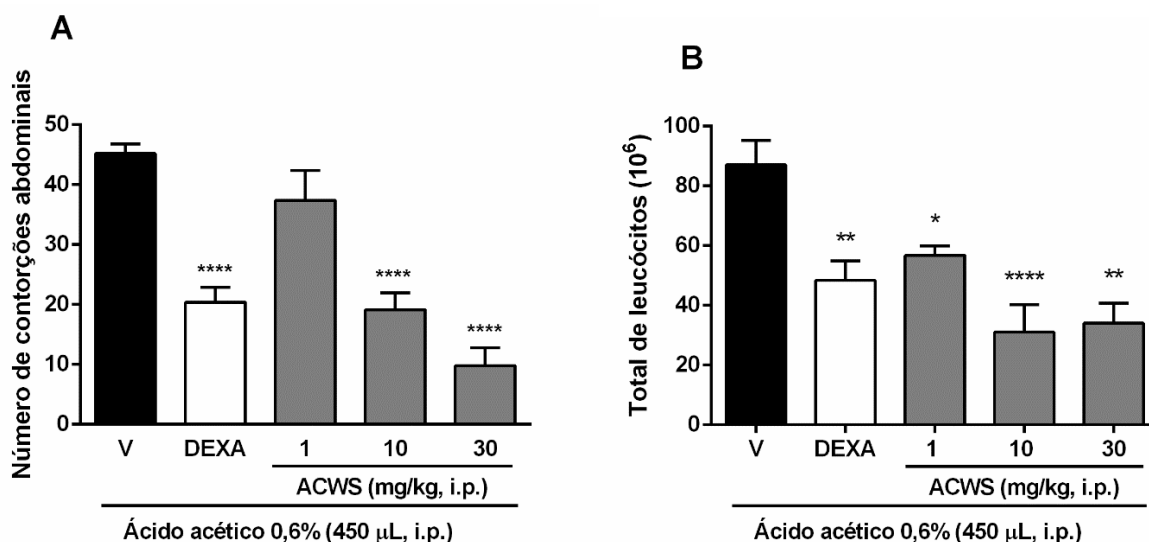


FIGURA 4 – Efeito da administração intraperitoneal do ACWS sobre as contorções abdominais e migração de leucócitos induzida por ácido acético 0,6% em camundongos. Número de contorções observadas cumulativamente no período de 20 minutos (Painel A) e número total de leucócitos observados em câmara de Neubauer (Painel B), nos camundongos pré-tratados com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (1, 10 e 30 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg). Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n= 5-6). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^* < 0,05$ $P^{**} < 0,01$; $P^{****} < 0,0001$.

6.3 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a alodinia mecânica e edema de pata induzidos por carragenina

A carragenina, quando administrada na pata do animal, foi capaz de induzir alodinia mecânica, confirmada pela redução da força correspondente a 50% de limiar de retirada de pata de 1,1g (basal) para 0,5g após 1h (grupo veículo). O pré-tratamento com ACWS na dose de 10 mg/kg, foi capaz de bloquear o desenvolvimento da alodinia mecânica induzida pela carragenina entre a 3^a a 6^a hora de medição, quando comparados ao grupo veículo (V: 1,1± 0,1 g) (FIGURA 5 – painel A). Vinte e quatro horas após a administração de carragenina, o efeito anti-alodínico do ACWS não foi mais observado, indicando que o seu efeito anti-inflamatório não permanece por mais de 24 horas. O pré-tratamento com ACWS também reverteu o edema de pata causado pela carragenina. O edema avaliado na 4^a, 5^a e 6^a horas foi significativamente reduzido em 63%, 64% e 54%, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (FIGURA 5 – painel B).

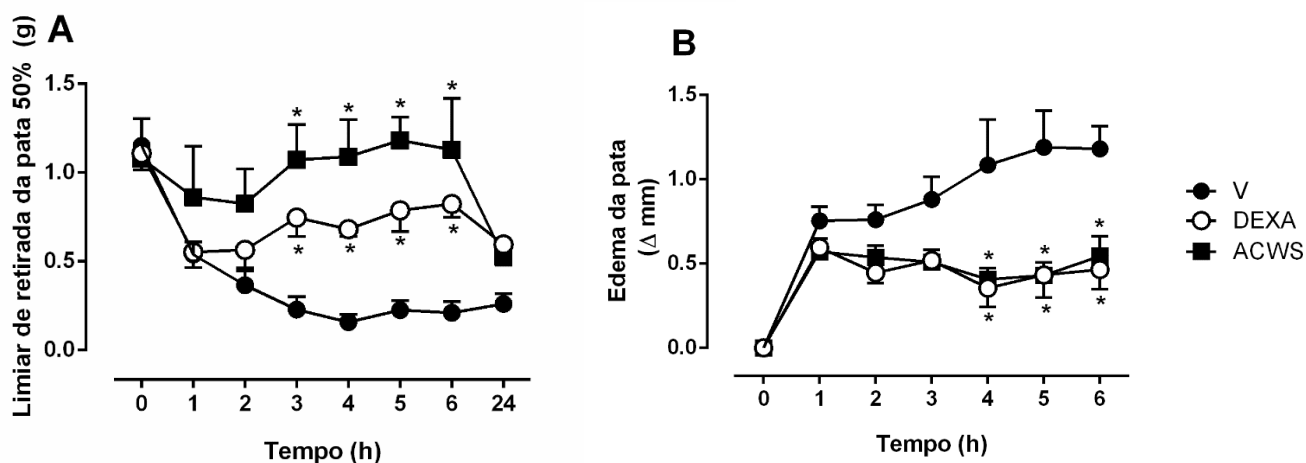


FIGURA 5 – Efeito da administração intraperitoneal do ACWS sobre a alodinia mecânica (painel A) e edema de pata (painel B) induzidos pela injeção intraplantar de carragenina, em camundongos. Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) pela via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina. Resultados expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 7). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo controle para $P^* < 0,05$.

6.4 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de glutathiona (GSH)

A injeção intraplantar de carragenina depletou os níveis de GSH na pata dos animais tratados com veículo em 81,0% quando comparados ao grupo naive (N: 13268,9 ± 3281,0 µg/g de tecido). O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg), reestabeleceu os níveis de GSH para 8280,8 e 7081,4 µg/g de tecido, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (V: 2502,1 ± 459,7 µg/g de tecido) (FIGURA 6).

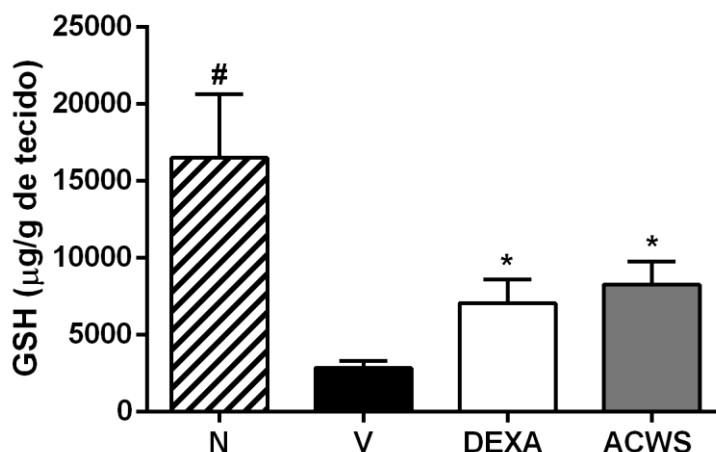


FIGURA 6 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de GSH. Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) pela via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de mieloperoxidase. Os resultados estão expressos como médias ± erro padrão das médias (n = 5-6). As comparações entre os grupos naive e veículo foram realizadas por teste *t* de Student; e entre ACWS e DEXA foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^{**} < 0,01$ e naive $P^{\#} < 0,05$.

6.5 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da LOOH

A injeção intraplantar de carragenina aumentou os níveis de lipoperóxidos na pata dos animais tratados com veículo em 61% quando comparado ao grupo naive (N: 11,0 ± 1,5 mmol/ mg de tecido). O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1

mg/kg) reduziu em 32% e 75%, respectivamente, os níveis de lipoperóxidos quando comparado ao grupo veículo (V: $28,0 \pm 1,0$ mmol/ mg de tecido) (FIGURA 7).

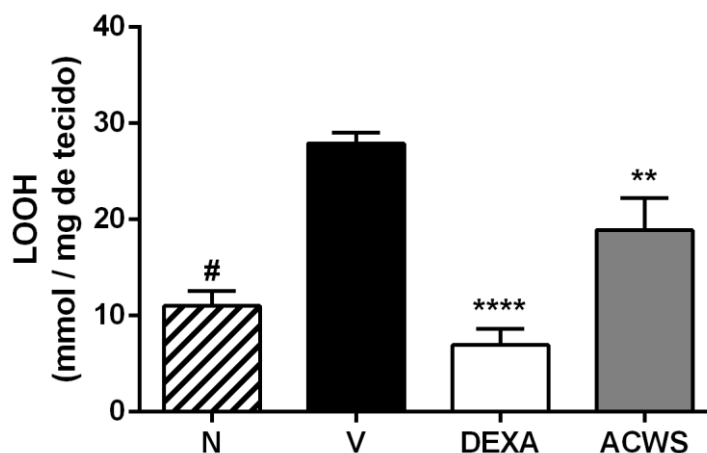


FIGURA 7 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação dos níveis de lipoperóxidos (LOOH). Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de catalase. Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6). As comparações entre os grupos naive e veículo foram realizadas por teste *t* de Student e entre ACWS e DEXA foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^{**} < 0,01$; $P^{****} < 0,0001$ e naive $P^{\#} < 0,05$.

6.6 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD).

A inflamação desencadeada pela carragenina acarretou na diminuição dos níveis da enzima SOD na pata dos animais tratados com veículo em 9,0% quando comparados ao grupo naive (N: $10,4 \pm 0,2$ U/ mg de proteína). O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg) aumentou os níveis de SOD em 19,0% e 20,0%, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (V: $9,4 \pm 0,1$ U/ mg de proteína) (FIGURA 8).

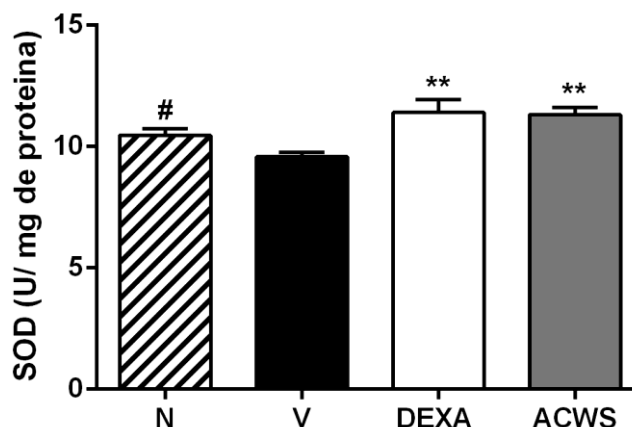


FIGURA 8 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis da enzima superóxido dismutase (SOD) . Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de mieloperoxidase. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6-7). As comparações entre os grupos naive e veículo foram realizadas por teste *t* de Student e entre ACWS e DEXA foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^{**} < 0,01$ e naive $P^{\#} < 0,05$

6.7 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação da atividade enzimática catalase (CAT)

A inflamação desencadeada pela injeção intraplantar de carragenina diminuiu a atividade da enzima catalase na pata dos animais tratados com veículo em 58,0% quando comparados ao grupo naive (N: $0,7 \pm 0,1$ D.O./ min / mg de proteína). O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg), reestabeleceu os níveis da catalase para 0,6 e 0,7 D.O./ min / mg de proteína, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (V: $0,3 \pm 0,1$ D.O./ min / mg de proteína) (FIGURA 9).

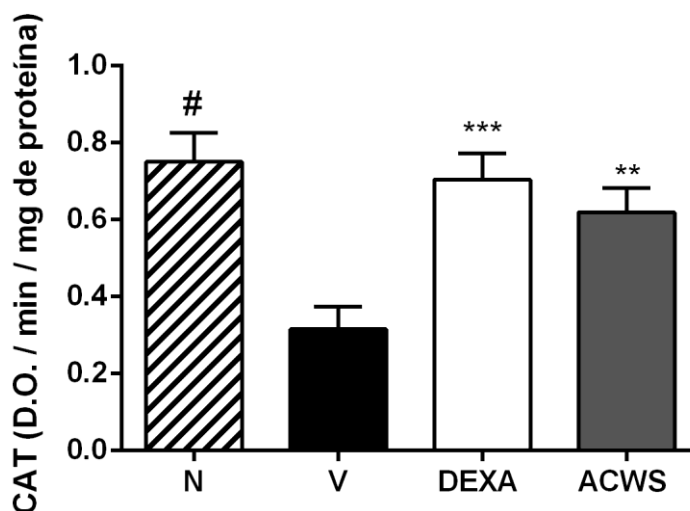


FIGURA 9 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na determinação enzimática da catalase. Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de catalase. Os resultados estão expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6-8). As comparações entre os grupos naive e veículo foram realizadas por teste *t* de Student e entre ACWS e DEXA foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^{**} < 0,01$; $P^{***} < 0,001$ e naive $P^{\#} < 0,05$.

6.8 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO)

A injeção intraplantar de carragenina aumentou os níveis de MPO na pata dos animais tratados com veículo em 30,0% quando comparados ao grupo naive (N: $2,6 \pm 0,1$ D.O./ mg de proteína). O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg), via intraperitoneal, reduziu significativamente os níveis da enzima mieloperoxidase em 26,1% e 11,6%, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (V: $3,4 \pm 0,1$ D.O./ mg de proteína) (FIGURA 10).

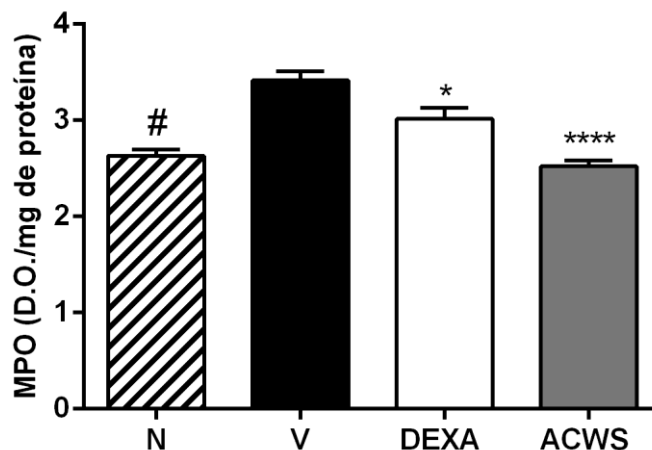


FIGURA 10 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis da enzima mieloperoxidase (MPO). Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de mieloperoxidase. Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 6-8). As comparações entre os grupos naive e veículo foram realizadas por teste *t* de Student e entre ACWS e DEXA foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^* < 0,05$; $P^{****} < 0,0001$ e naive $P \# < 0,05$.

6.9 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de TNF- α

O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (1 mg/kg), reduziu significativamente os níveis de TNF- α em 70% e 62%, respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (V: 1101,7 \pm 234,1 pg/ mg de proteína) (FIGURA 11).

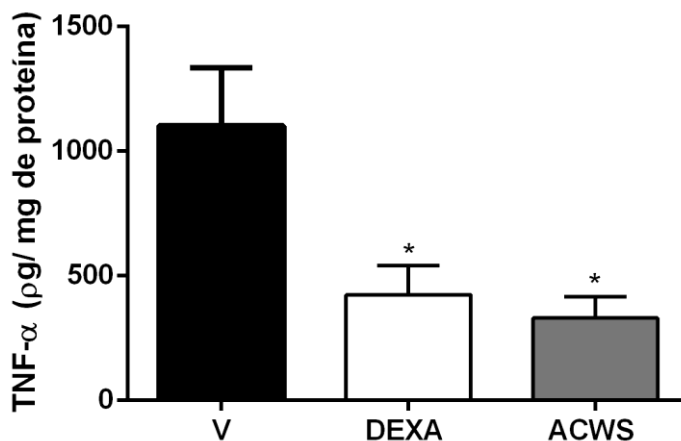


FIGURA 11 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na quantificação de TNF- α . Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de mediadores inflamatórios. Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 4). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^* < 0,05$.

6.10 Efeito da administração intraperitoneal de ACWS sobre os níveis de IL-1 β

O pré-tratamento com ACWS (10 mg/kg) não reduziu significativamente os níveis de IL-1 β . Contudo, o grupo que recebeu dexametasona (1 mg/kg) apresentou redução significativa de 27,0%; quando comparado ao grupo veículo (V: 1523,7 \pm 114,8 pg / ml) (FIGURA 12).

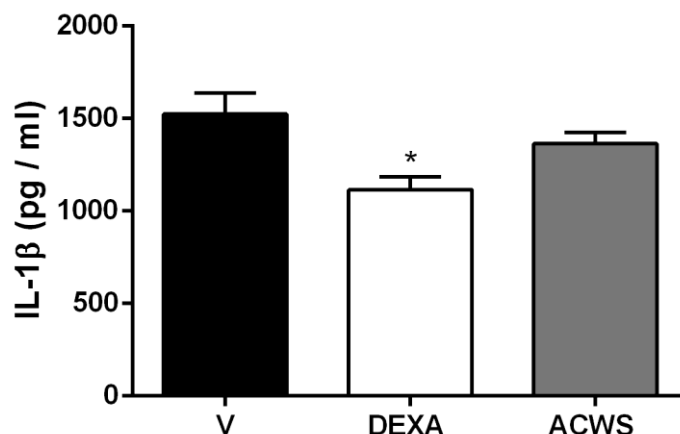
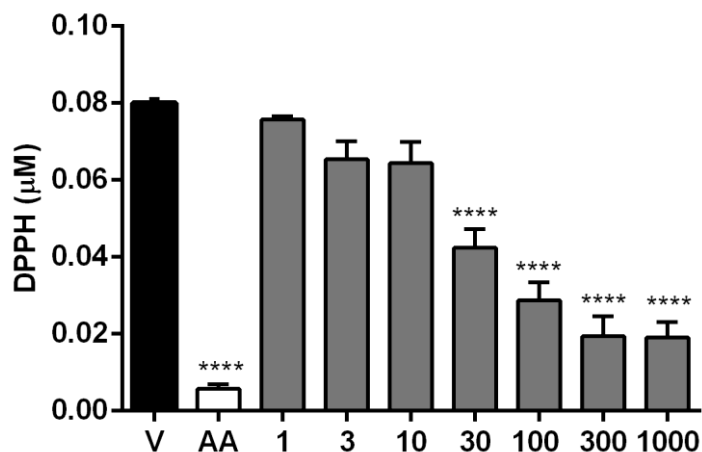


FIGURA 12 – Efeito da administração intraperitoneal de ACWS na quantificação de IL-1 β . Os animais receberam o pré-tratamento com veículo (V: salina 0,9%), ACWS (10 mg/kg) e dexametasona (DEXA: 1 mg/kg) via intraperitoneal, 30 minutos antes da injeção de carragenina e ao final do experimento, tiveram sua superfície plantar excisionada para dosagem de mediadores inflamatórios. Resultados expressos como médias \pm erro padrão das médias (n = 3). A comparação entre os grupos foi realizada através da análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni. Diferente do grupo veículo para $P^* < 0,05$.

6.11 Determinação do padrão antioxidante do composto ACWS através do sequestro do radical livre DPPH

Através desse ensaio para determinação de compostos antioxidantes pelo sequestro de DPPH, foi possível afirmar que o extrato péctico da acerola, denominado ACWS, possui efeito antioxidante quando comparado ao grupo veículo. As concentrações mais efetivas foram as de 300 e 1000 $\mu\text{g/ml}$, que conseguiram sequestrar igualmente 79,0% do radical livre DPPH. O ácido ascórbico (controle positivo) sequestrou o DPPH em 97 % quando comparado ao grupo veículo (V: 8,9 μM). O valor da CI_{50} para o sequestro de DPPH do ACWS ficou em 53,4 $\mu\text{g/ml}$ (FIGURA 13).



1

FIGURA 13 – Determinação do padrão antioxidante do composto ACWS através do sequestro do radical livre DPPH *in vitro*. Veículo (V: água destilada, controle negativo), ácido ascórbico (AA: 50 µg/mL, controle positivo) ou ACWS (1-1000 µg/mL), foram misturados com solução de DPPH (40 µg/mL). Valores expressos como média ± erro padrão da média de triplicata.

7. DISCUSSÃO

Diversos estudos têm mostrado que dietas ricas em frutas reduzem significativamente a incidência de diversas patologias. Seus efeitos benéficos à saúde são atribuídos a seus constituintes anti-inflamatórios e à sua atividade antioxidante (POPOV *et al.*, 2014). Os polissacarídeos, um dos compostos primários produzidos pelas plantas, têm ganhado destaque e são frequentemente estudados quanto à sua atividade biológica devido seu grande espectro terapêutico e toxicidade relativamente baixa (YANG *et al.*, 2010). Diversos trabalhos comprovaram os efeitos antiinflamatório e antinociceptivo (NASCIMENTO, *et al.*, 2014; RUTHES, *et al.*, 2013), gastroprotetor (CANTU-JUNGLES *et al.*, 2014; CORDEIRO *et al.*, 2012) e anticoagulante (OCHOA *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2016) de polissacarídeos obtidos de produtos naturais.

A acerola, de nome científico *Malpighia emarginata*, é uma fruta cítrica, nativa dos trópicos e subtropicais americanos, rica em ácido ascórbico, carotenoides e flavonoides. Seus efeitos biofuncionais incluem atividade antioxidante que previne doenças relacionadas com a idade, como cânceres, hipertensão, aterosclerose e infarto do

miocardio, inibindo a oxidação por sequestro dos radicais livres (ASSIS et al., 2007; MOTOHASHI et al., 2004; SCHRECKINGER et al., 2010; LEFFA, et al., 2016).

Desta forma, nosso trabalho teve como objetivo investigar o efeito análgésico e anti-inflamatório de um polissacarídeo péctico extraído da acerola (ACWS), quando administrado intraperitonealmente em camundongos.

Os primeiros resultados obtidos no presente estudo se mostraram positivos quanto às propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas do ACWS. O teste da formalina e o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético são comumente utilizados como *screening* de novas drogas (DUBUISSON *et al.*, 1977; MEDZHITOV, 2008). No teste da formalina, sua primeira fase (0 – 5min) é denominada de fase nociceptiva, e conta com a ativação direta dos nociceptores com conseqüente liberação de neuropeptídeos como substância P, CGRP e glutamato (TJØLSEN *et al.*, 1992); e sua segunda fase (15 – 30min) é denominada de inflamatória, em decorrência da liberação de mediadores inflamatórios como prostaglandinas, citocinas, histamina, entre outros. (DUBUISSON *et al.*, 1977; TJØLSEN *et al.*, 1992). Dessa maneira, foi possível observar que nosso composto não possui atividade analégsica direta, por não mostrar diferenças significativas entre os grupos tratados e o grupo controle na primeira fase (característica marcante de alguns fármacos com atividade analégsica). Contudo, o polissacarídeo péctico possui atividade anti-nociceptiva na segunda fase do teste, sugerida pela diminuição de mediadores inflamatórios, visto que reduziu significativamente o comportamento nociceptivo nas suas três doses (0,1, 1 e 10 mg/kg).

Como já estabelecido, o ácido acético causa uma nocicepção inflamatória visceral, envolvendo nociceptores periféricos polimodais (TRPV1, ASIC e receptores de glutamato) e mediadores inflamatórios endógenos (TNF- α , IL-1 β e IL-8), que por sua vez, estimulam o aumento da permeabilidade vascular e levam ao extravasamento de proteínas plasmáticas e migração de leucócitos para a cavidade peritoneal (COLLIER *et al.*, 1968; RIBEIRO *et al.*, 2000; IKEDA *et al.*, 2001; MEDZHITOV, 2008). Com isso, ele também é um bom experimento para avaliar parâmetros anti-inflamatórios e antinociceptivos. Condizendo com o esperado, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, os animais também demonstraram uma redução na nocicepção, confirmado pela diminuição no número de contorções abdominais, e uma redução nos parâmetros inflamatórios através da redução no número de leucócitos na cavidade peritoneal, sugerindo também, que o efeito do ACWS pode ser atribuído a redução de mediadores

inflamatórios. Diversos outros trabalhos já publicados demonstraram o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de pectinas, como o trabalhos de DO NASCIMENTO, *et al.*, 2014, no qual pectinas extraídas do tamarillo obtiveram resultados positivos nos testes de nocicepção induzidos por ácido acético e formalina.

A fim de estender os estudos sobre a ação antinociceptiva e anti-inflamatória do ACWS, utilizou-se o modelo de inflamação induzido por carragenina. A carragenina é caracterizada por induzir uma resposta inflamatória aguda revelada por edema e sensibilidade à estímulos não nocivos (alodínia) (WINTER *et al.*, 1962). Nesse experimento, a dose escolhida foi a de 10 mg/kg, visto que nos testes de formalina e ácido acético essa dose foi a mais efetiva. Através do teste de alodinia mecânica pelo método *up-and-down*, avaliou-se que o pré-tratamento com o polissacarídeo foi capaz de bloquear o desenvolvimento da alodinia mecânica induzida pela carragenina nas horas 3, 4, 5 e 6 de medição e também foi capaz de reverter o edema de pata causado por ela. O ACWS não foi capaz de bloquear a alodinia mecânica após 24 horas de sua administração, sugerindo que seu efeito anti-inflamatório não permanece após esse período. Esses dados corroboram os resultados anteriores obtidos nos modelos de formalina e ácido acético.

A inflamação induzida pela carragenina é desencadeada pelo envolvimento de diversos mediadores pró-inflamatórios como neuropeptídeos, prostaglandinas, NO e citocinas (DE CASTRO FRANÇA, *et al.*, 2007). A MPO, enzima característica de processos inflamatórios, está presente em neutrófilos que migram para o local da inflamação. Sua dosagem avalia indiretamente a infiltração dessas células para a pata do animal, onde foi injetado a carragenina. O pré-tratamento com ACWS conseguiu inibir significativamente a atividade da MPO, indicando uma redução na migração de neutrófilos para a região, e conseqüentemente redução do processo inflamatório. O TNF- α e a IL-1 β são citocinas pró-inflamatórias liberadas por macrófagos, neutrófilos e outras células do sistema imune na inflamação induzida por carragenina. Elas induzem e mantêm quadros de hiperalgesia e agem em diferentes cascatas liberando outros mediadores inflamatórios como IL-6 e IL-8. A administração de ACWS foi capaz de diminuir os níveis de TNF- α , corroborando os resultados da MPO como um indicativo da redução da migração de neutrófilos na pata dos camundongos e conseqüente redução da liberação de citocinas inflamatórias. Os valores para IL- β são preliminares e não tiveram diferenças significativas quando comparados ao grupo veículo, sugerido pelo baixo número de amostras. Nossos

resultados estão de acordo com outros trabalhos já publicados envolvendo propriedades anti-inflamatórias de polissacarídeos, como mostrado por Maria-Ferreira *et al.* (2014), que evidenciou que uma ramnogalacturonana extraída da *Acmella oleracea* diminuiu os níveis de TNF- α em um modelo de úlcera gástrica crônica, com uma importante atividade anti-inflamatória. Ainda, em outro modelo de doença do trato gastrointestinal, Ye *et al.* (2010) demonstraram que uma pectina da maçã também reduziu os níveis de TNF- α em camundongos com deleção gênica para IL-10, que desenvolvem colite ulcerativa espontaneamente, evidenciando o efeito benéfico das pectinas em aliviar os sintomas inflamatórios em um modelo de doença inflamatória intestinal.

Além disso, foi demonstrado que polissacarídeos pécticos isolados da *Capsicum annuum* reduzem a liberação de TNF- α e IL-1 β em cultura de células THP-1 estimuladas com LPS, comprovando e reforçando o efeito anti-inflamatório e imunomodulador de polissacarídeos (do Nascimento *et al.*, 2017).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são subprodutos do metabolismo celular normal, e são essenciais para manter diversos processos fisiopatológicos e bioquímicos, mantendo a homeostase celular devido ao equilíbrio entre sua formação e remoção; quando ocorrem alterações no estado de equilíbrio, as EROs tornam-se altamente tóxicas para o organismo, podendo levar a morte celular por oxidação generalizada de macromoléculas como lipídios e proteínas, além de agravar processos inflamatórios (RASILAINEN *et al.*, 2002; STEPHENS *et al.*, 2009). As EROs agem de diversas maneiras, seja oxidando sequências gênicas e alterando sua regulação, oxidando proteínas e alterando os processos de expressão gênica, diminuindo a atividade de reparo do DNA ou aumentando a lipoperoxidação – promovendo mutações que comprometem o funcionamento correto da célula. Todos esses processos podem levar ao aumento da transcrição e liberação de fatores inflamatórios (BHATTACHARYYA, 2014). Diversos trabalhos já publicados demonstram o potencial antioxidante de polissacarídeos como em CAI *et al.*, 2018 e GAO *et al.*, 2014. KLOSTERHOFF, *et al.*, 2017 avaliaram a atividade anti-fadiga do ACWS no teste de natação forçada, a atividade antioxidante do polissacarídeo no hipocampo do cérebro de ratos, obtendo resultados satisfatórios. Nesse contexto, foram realizados testes para avaliar os parâmetros antioxidantes do ACWS sobre o quadro de inflamação induzida por carragenina, através de ensaios para determinação da atividade enzimática da superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), para determinação dos níveis de glutathiona (GSH) e lipoperoxídeos (LPO) e analisar o

potencial antioxidante do polissacarídeo, *in vitro*, através da depleção de DPPH. Como esperado, os grupos veículos de todos os ensaios tiveram seus parâmetros antioxidantes condizentes com o quadro de inflamação instaurado. A enzima superóxido dismutase (SOD) é responsável pela dismutação de moléculas de superóxido (O_2^-) em peróxido de hidrogênio e água; já a enzima catalase (CAT) é responsável pela conversão de peróxido de hidrogênio em oxigênio e água (MELONI, 2003); e em processos inflamatórios suas atividades se encontram reduzidas. Em nosso estudo, foi observado que o grupo veículo apresentou uma redução nos níveis das enzimas SOD e CAT, sugerindo a presença do quadro inflamatório; nos grupos pré-tratados com o polissacarídeo, as atividades de ambas foram aumentadas significativamente, prevenindo a alteração dos padrões normais da atividade enzimática dessas enzimas com características antioxidantes e corroborando seu potencial anti-inflamatório.

Assim como a catalase, a glutathiona (GSH) participa das reações que transformam peróxido de hidrogênio em oxigênio e água. Ela faz parte dos antioxidantes endógenos não enzimáticos e é encontrada em todas as células eucarióticas associando-se a enzimas como glutathiona redutase (GPX) e glutathiona-S-transferase (GST), para formar o sistema glutathiona (BHATTACHARYYA, 2014). Em processos inflamatórios seus níveis estão diminuídos – o que foi possível observar a partir dos nossos dados – e como o esperado, o pré-tratamento com ACWS foi capaz de inibir a diminuição de GSH que ocorre durante a inflamação.

A lipoperoxidação é um processo que resulta da deterioração por oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA); esses ácidos graxos estão presentes em grande quantidade nas membranas celulares, e sua proteção contra oxidação é essencial para manter o bom funcionamento da célula. As membranas celulares são estruturas fluidas (característica primordial para o bom desempenho de suas funções), e quando possuem seus ácidos graxos oxidados se tornam mais rígidas e viscosas, alterando suas funções. Os PUFAs são particularmente suscetíveis a oxidação devido ao seu grande número de duplas ligações carbono-carbono (REITER *et al.*, 2014). Assim, para verificar o potencial antioxidante do ACWS sobre a lipoperoxidação, foi realizado o método FOX-2 para mensuração direta dos peróxidos. Esse método consiste na utilização de ferro-xilenol laranja para tal determinação, e através dele foi possível observar que o polissacarídeo foi capaz de reduzir a lipoperoxidação devido a menor presença de LOOH por mg de tecido.

E por último, foi determinado o padrão antioxidante do ACWS através do teste de sequestro do radical livre DPPH; os antioxidantes são capazes de reduzir o radical estável DPPH em sua forma não-radical DPPH-H. O ACWS se mostrou eficiente em reduzir o DPPH, de maneira concentração/dependente, confirmando seu potencial antioxidante. Todos esses resultados positivos acerca dos parâmetros antioxidantes do ACWS corroboram os resultados de outros trabalhos já publicados sobre as propriedades antioxidantes de polissacarídeos, como em GOVIDAN, *et al.*, 2015, que demonstrou o efeito antioxidante de um polissacarídeo extraído da *Calocybe indica* sobre a atividade da SOD e CAT, níveis de GSH e sequestro de DPPH; em LIU, *et al.*, 2017 que demonstrou a atividade antioxidante de um polissacarídeo extraído da *Fomitiporia punctata*, sobre os mesmos parâmetros de avaliação; KLOSTERHOFF, 2018, que demonstrou previamente o efeito antioxidante do ACWS em fibroblastos por CORREA-FERREIRA, *et al.*, 2017, onde uma pectina extraída da *Artemisia campestris*, demonstrou ser efetiva no sequestro do radical DPPH, também nas concentrações de 300 e 1000 µg/mL.

Por meio da análise de todos os resultados obtidos, sugere-se que o potencial anti-inflamatório do polissacarídeo péctico rico em arabina extraído da acerola se deve aos efeitos antioxidante e anti-inflamatório, os quais limitam através de cascatas bioquímicas, a migração celular e a síntese de mediadores pró-inflamatórios, atenuando o desenvolvimento do processo inflamatório. Como citado anteriormente, o estudo dos polissacarídeos e suas propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes vem sendo cada vez maior; já são diversos os trabalhos publicados acerca do tema, e vale comentar o trabalho de POPOV, *et al.*, 2014, pelas suas semelhanças com a pesquisa e resultados obtidos por nós, no qual um polissacarídeo péctico extraído da ameixa (*Prunus domestica*) obteve resultados positivos como anti-inflamatório e antioxidante, sugerindo o promissor potencial dos polissacarídeos. Popularmente, o uso de pectinas para tratar doenças inflamatórias, como artrite, é cada vez maior. A ingestão de sucos cítricos são a forma mais comum de ingestão e inclusão dessas pectinas nas dietas pela população. Apesar de muitas indicações não terem estudos científicos, há evidências do potencial anti-inflamatório dessas pectinas; portanto é de grande interesse científico estudar e validar o efeito desses polissacarídeos pécticos em modelos de dor inflamatória (GOTT, Peter, 2004; WEISS, Thiago, 2016),

8. CONCLUSÃO

Em conjunto, os resultados obtidos neste trabalho comprovam que o polissacarídeo pécico extraído da acerola (*Malpighia emarginata* – ACWS) quando administrados sistemicamente, apresenta efeito analgésico em camundongos, reduzindo comportamentos nociceptivos em modelos experimentais de dor bem como a alodinia mecânica frente a sensibilização inflamatória, efeitos que podem estar intimamente correlacionados com a redução da infiltração celular e consequente diminuição da liberação de mediadores inflamatórios e estresse oxidativo. Estes resultados preliminares são de grande importância, pois revelam propriedades terapêuticas adicionais do polissacarídeo caracterizado como pectina rica em arabinana, evidenciando o potencial benéfico da acerola para saúde.

9. REFERÊNCIAS

ALI, G; KOPF, A. Breakthrough pain, the pain emergency, and incident pain. **Guide to Pain Management in Low-Resource Settings**, p. 277, 2010.

DE ASSIS, S.A et al. Acerola: importance, culture conditions, production and biochemical aspects. **Fruits**, v. 63, n. 2, p. 93-101, 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D., & ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **J Invest Dermatol.** v. 78, n. 3, p. 206-209, 1982.

CAI, Z. et al. Structural characterization, in vitro and in vivo antioxidant activities of a heteropolysaccharide from the fruiting bodies of *Morchella esculenta*. **Carbohydrate Polymers**, v. 195, p. 29-38, 2018.

CANTU-JUNGLES, T.M. et al. Polysaccharides from prunes: Gastroprotective activity and structural elucidation of bioactive pectins. **Food chemistry**, v. 146, p. 492-499, 2014.

CARVALHO, W.A., Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira Anestesiologia**, p. 137-158, 1998.

CHEN, C. et al. Suppression of endotoxin-induced proinflammatory responses by citrus pectin through blocking LPS signaling pathways. **Biochemical pharmacology**, v. 72, n. 8, p. 1001-1009, 2006.

COLLIER, H. O. J. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British journal of pharmacology and chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

CORDOVA, M.M., WERNER, M.F., SILVA, M.D., RUANI, A.P., PIZZOLATTI, M.G., SANTOS, A.R. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters** 495, 173–177, 2011.

CORRÊA-FERREIRA, M. L. et al. Gastroprotective effects and structural characterization of a pectic fraction isolated from *Artemisia campestris* subsp *maritima*. **International journal of biological macromolecules**, 2017.

CORTI, Angelo et al. Tumor necrosis factor (TNF) α quantification by ELISA and bioassay: effects of TNF α -soluble TNF receptor (p55) complex dissociation during assay incubations. **Journal of immunological methods**, v. 177, n. 1-2, p. 191-198, 1994.

DE CASTRO FRANCA, S.; CORREA, M.; DOS SANTOS SCHIVO, I. R.; GARCIA LEME, J.; GIGLIO, J. R. A low molecular weight proinflammatory factor from rat spleen lymphocytes. Isolation and partial characterization. **Inflammation**, v. 30, n. 3-4. P. 87-96, Aug 2007.

DE YOUNG, L. M.; KHEIFETS, J. B.; BALLARON, S. J., & YOUNG, J. M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents Actions**. v. 26, n. 3-4, p. 335-341, 1989.

DO NASCIMENTO, Georgia Erdmann et al. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 300-306, 2014.

DO NASCIMENTO, G.E. do et al. Arabinoxylan from Mucilage of Tomatoes (*Solanum lycopersicum* L.): Structure and Antinociceptive Effect in Mouse Models. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 64, n. 6, p. 1239-1244, 2016.

DO NASCIMENTO, G.E. et al. The influence of sweet pepper pectin structural characteristics on cytokine secretion by THP-1 macrophages. **Food Research International**, v. 102, p. 588-594, 2017.

DUBIN, Adrienne E.; PATAPOUTIAN, Ardem. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **The Journal of clinical investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760-3772, 2010.

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, v. 4, p. 161-174, 1977.

EDDY, NATHAN B.; LEIMBACH, DOROTHY. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

EDDY, NB; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl- and dithienylbutylamines. **J Pharmacol Exp Ther.** 107 (3): 385–393, 1953.

FEIN, A. **NOCICEPTORES: As células que sentem dor**. Ribeirão Preto: Dor On Line, 2011. 106 p. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/nociceptores>>.

GARCEZ, P.C. et al., **O segredo das frutas**. p. 29, 2001.

GARG, G., ADAMS, J.D., Treatment of neuropathic pain with plant medicines. **Chin J Integr Med**, p.565-570, 2012.

GAO, J. et al. Structural characterisation, physicochemical properties and antioxidant activity of polysaccharide from *Lilium lancifolium* Thunb. **Food chemistry**, v. 169, p. 430-438, 2015.

GOTT, P. Some swear by fruit pectin for pain. Disponível em: <<http://www.spokesman.com/stories/2004/jun/01/some-swear-by-fruit-pectin-for-pain/>>
Acesso em: 12 de junho de 2018.

GOVINDAN, S. et al. Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from *Calocybe indica* var. APK2. **Experimental and toxicologic pathology**, v. 68, n. 6, p. 329-334, 2016.

HUNSKAAR, S; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IASP, Taxonomia: nociceção. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Pain>>. Acesso em: 10 ago. 2017.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

JI, R.; CHAMESSIAN, A.; ZHANG, Y. Pain regulation by non-neuronal cells and inflammation. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 572-577, 2016.

JULIUS, D; ALLAN, I.B. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, vol. 413, p. 203, 2001.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British journal of anaesthesia**, v. 87, n. 1, p. 3-11, 2001.

KLOSTERHOFF, Rafael Roberto et al. Anti-fatigue activity of an arabinan-rich pectin from acerola (*Malpighia emarginata*). **International journal of biological macromolecules**, 2017.

KLOSTERHOFF, Rafael Roberto et al. Structure and intracellular antioxidant activity of pectic polysaccharide from acerola (*Malpighia emarginata*). **International journal of biological macromolecules**, v. 106, p. 473-480, 2018.

LEFFA, D.D. et al. Effects of Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Juice Intake on Brain Energy Metabolism of Mice Fed a Cafeteria Diet. **Molecular neurobiology**, v. 54, n. 2, p. 954-963, 2017.

LIU, Faaang et al. A novel polysaccharide with antioxidant, HIV protease inhibiting and HIV integrase inhibiting activities from *Fomitiporia punctata* (P. karst.) murrill (Basidiomycota, hymenochaetales). **International journal of biological macromolecules**, v. 97, p. 339-347, 2017.

LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.

LOESER, J.D, TREEDE, R-D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.; FRANCISCO, J. Matos. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2002.

MALMBERG, A. B.; BASBAUM, A. I. Partial sciatic nerve injury in the mouse as a model of neuropathic pain: behavioral and neuroanatomical correlates. **Pain**, v. 76, n. 1, p. 215-222, 1998.

MARCON, R. et al. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate. **Brain research**, v. 1295, p. 76-88, 2009.

MARKLUND S., MARKLUND G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **Eur J Biochem** v. 47: 469–474, 1974.

MEDZHITOV, Ruslan. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428, 2008.

MELONI, D. A. et al. Photosynthesis and activity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salt stress. **Environmental and Experimental Botany**, v. 49, n. 1, p. 69-76, 2003.

MEOTTI, F.C., COELHO IDOS, S., SANTOS, A.R. . The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **The Journal of Pain** 11, 570–578, 2010.

MOTOHASHI, N. et al. Biological activity of barbados cherry (acerola fruits, fruit of *Malpighia emarginata* DC) extracts and fractions. **Phytotherapy research**, v. 18, n. 3, p. 212-223, 2004.

DO NASCIMENTO, G.E. et al. Structure of an arabinogalactan from the edible tropical fruit tamarillo (*Solanum betaceum*) and its antinociceptive activity. **Carbohydrate polymers**, v. 116, p. 300-306, 2015.

PEIRS, Cedric; SEAL, Rebecca P. Neural circuits for pain: Recent advances and current views. **Science**, v. 354, n. 6312, p. 578-584, 2016.

PEREIRA, R.J.; DAS GRAÇAS CARDOSO, M. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of biotechnology and biodiversity**, v. 3, n. 4, 2012.

PINHO-RIBEIRO, Felipe A.; VERRI JR, Waldiceu A.; CHIU, Isaac M. Nociceptor sensory neuron-immune interactions in pain and inflammation. **Trends in immunology**, v. 38, n. 1, p. 5-19, 2017.

POPOV, Sergey V. et al. Pectic polysaccharides of the fresh plum *Prunus domestica* L. isolated with a simulated gastric fluid and their anti-inflammatory and antioxidant activities. **Food chemistry**, v. 143, p. 106-113, 2014.

OCHOA, Y. R. et al. Sulfation of fucogalactan from *Agaricus bisporus*: different patterns in the chemical structure and their effects on anticoagulant activity. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 357–364, 2017.

RASILAINEN, Suvi et al. Dose-dependent cysteine-mediated protection of insulin-producing cells from damage by hydrogen peroxide. **Biochemical pharmacology**, v. 63, n. 7, p. 1297-1304, 2002.

RANG, H.P., DALE, M.M., et al. **Farmacologia**, 7^a edição, p. 503, 2012.

REITER, Russel J.; TAN, Dun-Xian; GALANO, Annia. Melatonin reduces lipid peroxidation and membrane viscosity. **Frontiers in physiology**, v. 5, p. 377, 2014.

RIBEIRO, Ronaldo A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European journal of pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RODRIGUES, M.R.A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **Journal of ethnopharmacology**, v. 139, n. 2, p. 519-526, 2012.

RUTHES, A.C. et al. Lactarius rufus (1→3),(1→6)-β-d-glucans: Structure, antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Carbohydrate polymers**, v. 94, n. 1, p. 129-136, 2013.

SAMAD, T.A. et al. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471, 2001.

SANTANA, A. G. et al. Identification of potential targets for an anticoagulant pectin. **Journal of Proteomics**, 2016.

SCHRECKINGER, M.E. et al. Berries from South America: a comprehensive review on chemistry, health potential, and commercialization. **Journal of medicinal food**, v. 13, n. 2, p. 233-246, 2010.

SCHOLZ, Joachim; WOOLF, Clifford J. Can we conquer pain?. **Nature neuroscience**, v. 5, p. 1062, 2002.

SELTZER, Z.; DUBNER, R.; SHIR, Y. A novel behavioral model of neuropathic pain disorders produced in rats by partial sciatic nerve injury. **Pain**, v. 43, p. 205-218, 1990.

SHINDOU, H. Relief from neuropathic pain by blocking of the platelet-activating factor–pain loop. **The FASEB Journal**, 2017

SINATRA, R. S.; NALINI, V.; WHITNEY, C. J. Pain Physiology and Pharmacology. **Acute Pain Management**, v. 1, p. 4–5, 2009.

SINGH, Ajeet Kumar; KUMAR, Sanjay; VINAYAK, Manjula. Recent development in antihyperalgesic effect of phytochemicals: anti-inflammatory and neuro-modulatory actions. **Inflammation Research**, p. 1-22, 2018.

STEPHENS, J.W.; KHANOLKAR, M.P.; BAIN, S.C. The biological relevance and measurement of plasma markers of oxidative stress in diabetes and cardiovascular disease. **Atherosclerosis**, v.202, p.321–329, 2009.

SURAI, P. F. et al. Fatty acid composition, glutathione peroxidase and superoxide dismutase activity and total antioxidant activity of avian semen. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology**, v. 120, n. 3, p. 527-533, 1998.

TJØLSEN, Arne et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TRACEY, W. D. Jr.; Primer nociception. **Current Biology Magazine**, v. 2, R123 – R138, 2017.

UCHIDA, Eriko et al. Absorption and excretion of ascorbic acid alone and in acerola (*Malpighia emarginata*) juice: comparison in healthy Japanese subjects. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, n. 11, p. 1744-1747, 2011.

UZKESER, H., CADIRCI, E., HALICI, Z., ODABASOGLU, F., POLAT, B., YUKSEL, T. N., ATALAY, F. (2012). Anti-Inflammatory and Antinociceptive Effects of Salbutamol on Acute and Chronic Models of Inflammation in Rats: Involvement of an Antioxidant Mechanism. **Mediators of Inflammation**, 2012.

VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. OS produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WEISS, T. Fruit pectin for arthritis pain and inflammation. Disponível em: < <https://www.disabled-world.com/fitness/nutrition/fruits-veggies/pectin.php> > Acesso em: 12 de junho de 2016.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, v. 111, n. 3, p. 544-547, 1962.

YADAV, R; WENG, H. EZH2 regulates spinal neuroinflammation in rats with neuropathic pain. **Neuroscience**, v. 349, p. 106-117, 2017.

YE MB, Lim BO. Dietary pectin regulates the levels of inflammatory cytokines and immunoglobulins in interleukin-10 knockout mice. **J Agric Food Chem**. 2010 Nov 10;58(21):11281-6. doi: 10.1021/jf103262s.

ZEILHOFER, Hanns Ulrich. Synaptic modulation in pain pathways. In: **Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology**. Springer Berlin Heidelberg, 2005. p. 73-100.

ZHANG, J; DENG, X. Bupivacaine effectively relieves inflammation-induced pain by suppressing activation of the NF- κ B signalling pathway and inhibiting the activation of spinal microglia and astrocytes. **Experimental and Therapeutic Medicine**, v. 13, n. 3, p. 1074-1080, 2017.

ZHANG, M. Helicid alleviates pain and sleep disturbances in a neuropathic pain-like model in mice. **Journal of Sleep Research**, v. 26, n. 3, p. 386-393, 2017.

10. APÊNDICE 1 – COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA/BIO)



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1104

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.200345/2017-40

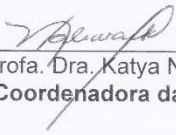
APROVADO/APPROVAL: 19/09/2017 – R.O. 08/2017

TÍTULO: Estudo das propriedades analgésicas e anti-inflamatórias de uma pectina obtida da acerola (*Malpighia emarginata*) em camundongos.

TITLE: Study of the analgesic and anti-inflammatory properties of a pectin obtained from acerola (*Malpighia emarginata*) in mice.

AUTORES/AUTHORS: Maria Fernanda de Paula Werner, Paula Giovanna Ciapparini, Jorge Luiz Dallazen, Bruna Barbosa da Luz, Daniele Maria Ferreira.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia


Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA