

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Byrsonima
duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae)

CURITIBA

2014

MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Byrsonima*
duckeana W. R. Anderson (Malpighiaceae)

Trabalho apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Obdúlio Gomes Miguel.

Co-orientador: Marilis Dallarmi Miguel.

CURITIBA

2014

Verdam, Maria Christina dos Santos

Contribuição ao estudo fitoquímico e biológico de *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (*Malpighiaceae*) / Maria Christina dos Santos Verdam – Curitiba, 2014.
146 f. : il. (algumas color.) ; 30 cm.

Orientador: Professor Dr. Obdúlio Gomes Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Marilis Dallarmi Miguel

Tese (doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas,
Setor de Ciências da Saúde. Universidade Federal do Paraná. 2014.

Inclui bibliografia

1. *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson. 2. Farmacologia. 3. Antioxidante.
4. Amazônia. 5. Citotoxicidade. I. Miguel, Obdúlio Gomes. II. Miguel, Marilis Dallarmi.
- III. Universidade Federal do Paraná. IV. Título.

CDD 615.32

TERMO DE APROVAÇÃO

MARIA CHRISTINA DOS SANTOS VERDAM

Título: "CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae)"

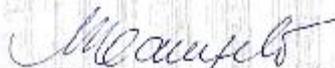
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção de grau de Doutor, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal do Paraná, área de concentração: Insumos, medicamentos e correlatos.



Prof. Dr. Obdulio Gomes Miguel
Orientador



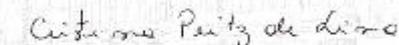
Prof. Dr. Eliane Carneiro Gomes
Universidade Federal do Paraná



Prof. Dr. Patrícia Maria Stuelp Campelo
Pontifícia Universidade Católica do Paraná



Prof. Dr. Cláudia Alexandra Andrade
Faculdades Integradas do Brasil



Prof. Dr. Cristina Peitz Lima
Faculdades Integradas do Brasil

Curitiba, 27 de novembro de 2014.

Dedico este trabalho aos dois anjos que Deus colocou em minha vida para me acolher e ajudar em minha jornada, meus pais Vicente e Carminha.

Árdua é a missão de desenvolver e defender a Amazônia . Muito mais difícil, porém, foi a de nossos antepassados em conquistá-la e mantê-la .”

General Rodrigo Octávio

AGRADECIMENTOS

Começo essa seção com uma frase que sempre tocou meu coração: Grandes coisas fez o Senhor por mim. Com certeza escrever uma tese é uma das provas das maravilhas que o Deus a quem eu sirvo me concedeu.

Essa tese poderia ser dedicada aos meus dois amores, Júnior e Athina. Mas não será. Isso porque essa tese é deles também. Athina esteve na minha barriga boa parte dela e em meus braços outra parte. Júnior a planejou junto comigo, corrigiu, ouviu, deu palpites, procurou pessoas, leu artigos, imprimiu. A tese é dele também. Então eu a dedico aqueles que me ensinaram as primeiras palavras e de todo os corações me aceitaram em suas vidas: meu pai Vicente e minha mãe Carminha.

Tenho muitos agradecimentos a fazer. Lembro-me perfeitamente do dia em que soubemos que moraríamos alguns anos em Curitiba. Neste dia, eu jamais poderia imaginar que seria abençoada com tantos amigos. Isso porque os anos de doutorado me trouxeram mais que a aprendizagem acadêmica. Eles me ensinaram lições sobre lealdade, amizade, apoio e outros sentimentos hoje ditos em falta. Agradeço então aos meus amigos Vinícius Bednarczuk, Beatriz Hirota, Cristiane Paula, Milena Kalegari, Cristina Mayumi, por todo apoio, pelas conversas, correções, risadas. Pelos momentos que passamos juntos, com a chegada de bebês, Ryu, Athina e Valenthina, os aniversários, os encontros sem motivo e pelas palavras de incentivo.

As minhas amigas Fernanda Smolarek, Patrícia Pavan e Camila Mercali, pela amizade sólida e verdadeira que construímos. Ela tornou o caminho mais leve.

Meu agradecimento especial a minha amiga Professora Mestre Fernanda Guilhon Simplício. A distância entre Amazonas e Paraná, não diminuiu nossos laços de afeto e amizade. Ao contrário, lhe agradeço por tudo o que me ensinou. Este doutorado não seria possível sem sua ajuda. Obrigada por sempre estar disposta em todos os momentos que precisei.

A professora Doutora Patrícia Maria Stuelp-Campelo, por sua amizade e orientação. Obrigada pelas maravilhosas palavras nos momentos de dificuldade. Pelo apoio nos testes realizados.

Aos Professores Obdúlio Gomes Miguel e Marilis Dallarmi Miguel por terem me recebido em sua equipe.

Aos amigos do Hospital-Geral de Curitiba, que torceram, perguntaram e ajudaram da forma que puderam. Obrigada.

Agradeço a minha família como um todo, e a família Verdum, a qual agora eu faço parte. Obrigada pela ajuda e por terem torcido por mim.

Vou embora de Curitiba mas levo no coração a saudade e também todas as lembranças de um povo acolhedor e amigo. E espero voltar para ver as conquistas de todos os amigos queridos que estiveram comigo nesta jornada.

RESUMO

Espécies vegetais são utilizadas ao longo da história da humanidade como recurso para cura e alívio dos mais diversos males. O conhecimento empírico a respeito de diferentes espécies vegetais se tornou uma ferramenta importante na descoberta de substâncias que possam fazer parte do arsenal terapêutico. Baseados nessa premissa o presente trabalho tem como objetivo verificar as informações acerca de atividades biológicas e traçar perfil fitoquímico da espécie vegetal amazônica – *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson. O perfil fitoquímico delineou metabólitos secundários de interesse biológico, tais como a presença de flavonóides, esteróides, terpenos e taninos. O perfil cromatográfico constatou a presença de ácido gálico e as técnicas de elucidação estrutural permitiram que se constatasse a presença do terpeno Friedelina. Na busca por atividades biológicas e farmacológicas, a espécie apresentou atividades de grande interesse, com grande potencial antioxidante e baixa toxicidade, dada a ausência de citotoxicidade no modelo *Artemia salina* e no ensaio *in vivo* de toxicidade aguda. Os ensaios farmacológicos demonstraram atividade antiinflamatória e analgésica, em especial para a fração acetato de etila, corroborando com estudos de outras espécies do gênero. Foi encontrada ainda atividade citotóxica no modelo de cultura celular, em células HT29 e atividade hemolítica. Dessa forma, *Byrsonima duckeana* mostrou ser uma espécie interessante quimicamente e farmacologicamente.

Palavras-chave: *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson, Farmacologia, Antioxidante, Amazônia, Citotoxicidade.

ABSTRACT

Plant species are used throughout the history of mankind as a resource for healing and relief from various ailments . Empirical knowledge about different plant species has become an important tool in the discovery of substances which may form part of the therapeutic arsenal. Based on this premise this study aims to determine information about the biological activities and tracing phytochemical profile of Amazonian plant species - *duckeana* Byrsonima WR Anderson. The phytochemical profile outlined secondary metabolites of biological interest , such as the presence of flavonoids , steroids , terpenoids and tannins . The chromatographic profile showed the presence of gallic acid and structural elucidation techniques have allowed it appeared the presence of terpene friedelin . In the search for biological and pharmacological activities , the species was of great interest activities with great antioxidant potential and low toxicity , given the absence of cytotoxicity in the model brine shrimp assay and in vivo acute toxicity . Pharmacological studies demonstrated anti-inflammatory and analgesic activity , especially for the ethyl acetate fraction , corroborating studies of other species of the genus . Cytotoxic activity was also found in the cell culture model , in HT29 cells and low hemolytic activity . Thus , *Byrsonima duckeana* proved to be an interesting specie chemically and pharmacologically.

Keywords : *Byrsonima duckeana* W.R Anderson, Pharmacology, Antioxidant, Amazon, Cytotoxicity .

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	DISTRIBUIÇÃO DOS BIOMAS BRASILEIROS. DESTAQUE PARA O ENORME BIOMA DA AMAZÔNIA	29
FIGURA 2	LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA FLORA DA RESERVA DUCKE	31
FIGURA 3	DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE <i>BYRSONIMA DUCKEANA</i> W.R. ANDERSON NO BRASIL	45
FIGURA 4	ESQUEMA GERAL DA DOR E HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA	51
FIGURA 5	FIGURA ILUSTRATIVA DO DEPÓSITO DE EXSICATAS DE <i>BYRSONIMA DUCKEANA</i> NO HERBÁRIO DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA DESTAQUE PARA COLETA DO MARCO 2703.....	54
FIGURA 6	NUMERAÇÃO DE <i>BYRSONIMA DUKEANA</i> W.R. ANDERSON NA RESERVA DUCKE	55
FIGURA 7	FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE NO LOCAL DA COLETA.....	55
FIGURA 8	APARELHO DE SOXHLET UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO.....	61
FIGURA 9	PREPARO DAS AMOSTRAS EM DISCO DE PAPEL PARA ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM ÁGAR SANGUE	66
FIGURA 10	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA	74
FIGURA 11	TESTE PLACA QUENTE	77
FIGURA 12	FLUXOGRAMA COM ENSAIOS REALIZADOS NO PRESENTE TRABALHO	77
FIGURA 13	FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E DO FRACIONAMENTO COM RENDIMENTOS	80
FIGURA 14	FLUXOGRAMA COM ETAPAS DO ISOLAMENTO DE SUBSTÂNCIAS	84
FIGURA 15	CROMATOGRAMA DO EXTRATO BRUTO DE <i>B.</i> <i>DUCKEANA</i> W.R ANDERSON	85
FIGURA 16	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	86
FIGURA 17	PERFIL CROMATOGRÁFICO DO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO	87

FIGURA 18	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLORFÓRMIO DE <i>B. DUCKENANA</i> ADICIONADA DE ÁCIDO GÁLICO.....	87
FIGURA 19	ESPECTRO DE U.V DO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO.....	88
FIGURA 20	ESPECTRO DE U.V DO PICO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 4,87 MINUTOS NA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO	88
FIGURA 21	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA	89
FIGURA 22	ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO	89
FIGURA 23	ESPECTRO DE RMN 1H (CDCL ₃ 200 HZ) DA SUBSTÂNCIA 1	91
FIGURA 24	DETALHAMENTO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ENTRE 0,75 E 2,50 DO ESPECTRO DE RMN 1H DA SUBSTÂNCIA 1	91
FIGURA 25	ESPECTRO DE RMN 13C DA SUBSTÂNCIA 1.....	92
FIGURA 26	DETALHAMENTO DO ESPECTRO DE RMN 13C DA SUBSTÂNCIA 1 COM EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 210 δ E 215 δ	93
FIGURA 27	ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPENO FRIEDELINA ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO.	95
FIGURA 28	CITOTOXICIDADE EM ENSAIO MTT EM CÉLULAS HT29.	95
FIGURA 29	CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE <i>BYRSONIMA DUCKEANA</i> W.R. ANDERSON NO ENSAIO MTT CÉLULAS DA LINHAGEM U937.....	99
FIGURA 30	RESULTADO DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM TUBOS	102
FIGURA 31	RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO.....	103
FIGURA 32	RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO DE <i>B. DUCKENANA</i>	106

FIGURA 33	RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO MODELO DPPH.....	108
FIGURA 34	RESULTADOS ENCONTRADOS NO ENSAIO ANTIOXIDANTE MODELO TBARS	110
FIGURA 35	EFEITO ANTINOCICEPTIVO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO AQUOSO DE <i>B. DUCKEANA</i> EM RELAÇÃO À PRIMEIRA (2A) E SEGUNDA (2B) FASE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS	113
FIGURA 36	EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE <i>B. DUCKEANA</i> SEGUIDA DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE CARRAGENINA 1% EM CAMUNDONGOS. CONTAGEM DE LEUCÓCITOS.....	115
FIGURA 37	EFEITO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO AQUOSO DE <i>B. DUCKEANA</i> NO EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS PARA O EXSUDATO PERITONEAL INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE CARRAGENINA 1% EM CAMUNDONGOS	117
FIGURA 38	CONTAGEM DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS	121
FIGURA 39	MÉDIA DO TEMPO DE LATÊNCIA PARA RESPOSTA AO ESTÍMULO DOLOROSO, 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS	122

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1	USOS ETNOFARMACOLÓGICOS DO GÊNERO <i>BYRSONIMA</i>	34
TABELA 2	TRABALHOS RELACIONADOS COM A PRESENTE PESQUISA EXECUTADOS COM ESPÉCIES DE <i>BYRSONIMA</i>	35
TABELA 3	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE ESPÉCIES DO GÊNERO <i>BYRSONIMA</i> (EM ORDEM ALFABÉTICA)	37
TABELA 4	DADOS DE RMN ¹³ C (125 MHZ, CDCL ₃) DA SUBTÂNCIA 1 EM COMPARAÇÃO AOS DADOS DA LITERATURA	94
TABELA 5	RESULTADOS OBTIDOS PELO DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS ATRAVÉS DO ENSAIO FOLIN CIOCALTEAU	105
QUADRO 1	AVALIAÇÃO DE RESULTADOS EM TESTES PARA DETECÇÃO DE ALCALÓIDES	57
QUADRO 2	QUANTIDADES DE REAGENTES PARA ENSAIO DE HEMÓLISE EM TUBOS	67
QUADRO 3	PARÂMETROS AVALIADOS PARA REALIZAÇÃO DE TESTE HIPOCRÁTICO ...	75
QUADRO 4	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR.....	81
QUADRO 5	RESULTADOS ENCONTRADOS NOS ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS MODELOS FOSFOMOLIBDÊNIO E DPPH ..	109

LISTA DE ABREVIATURAS

BHT	DI-TERC-BUTIL-METIL-FENOL
CCD	CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA
CLAE	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA
COX	CICLOXIGENASE
DNA	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
DPPH	2,2-DIFENIL-1-PICRILHIDRAZILA
EROS	ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO
INPA	INSITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
MPV	MATÉRIA PRIMA VEGETAL
MTT	(3-(4,5-DIMETILAZOL-2YL-) 2,5 DIFENILBROMETO DE TETRAZOLINA)
OMS	ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE
PBS	TAMPÃO FOSFATO SALINO
PLC	FOSFOLIPASE C
PLCA2	FOSFOLIPASE A2
PLCA2	FOSFOLIPASE A2
PNPIC	POLÍTICA NACIONAL DE PRÁTICAS INTEGRATIVAS E COMPLEMENTARES
PUC	PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA
RFAD	RESERVA FLORESTAL ADOLPHO DUCKE
SUS	SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE
TBARS	SUBSTÂNCIAS REATIVAS AO ÁCIDO TIOBARBITÚRICO
UFAM	UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	20
2	OBJETIVOS	22
2.1	GERAL	22
2.2	ESPECÍFICOS	22
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1	O REINO VEGETAL COMO FONTE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS.....	24
3.2	A REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA COMO FONTE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS	27
3.3	A FAMÍLIA MALPIGHIACEAE	29
3.4	A RESERVA ADOLFO DUCKE.....	31
3.5	O GÊNERO <i>BYRSONIMA</i>	32
3.6	<i>BYRSONIMA DUCKEANA</i> W.R ANDERSON	44
3.7	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	46
3.8	INFLAMAÇÃO E DOR	47
4.	MATERIAL E MÉTODOS	53
4.1	OPERAÇÕES PRELIMINARES	53
4.1.1	Coleta do material botânico	53
4.1.2	Conservação da matéria prima vegetal	56
4.2	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS	56
4.3	ANÁLISE FITOQUÍMICA	56
4.3.1	Metabólitos solúveis em álcool	57
4.3.1.1	Pesquisa de alcalóides	57
4.3.1.2	Pesquisa de leucoantocianidinas	58
4.3.1.3	Pesquisa de heterosídeo flavônico	58
4.3.1.4	Pesquisa de flavonóis	58

4.3.1.5	Pesquisa de esteróides e triterpenos	59
4.3.2	Preparo do extrato aquoso	59
4.3.2.1	Pesquisa de heterosídeos saponínicos	59
4.3.1.5	Pesquisa de cumarinas	60
4.3.2.3	Pesquisa de taninos	60
4.4	OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO	60
4.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS	60
4.6	IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS	62
4.7	CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA	62
4.8	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL	62
4.9	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	62
4.9.1	<i>Artemia salina</i>	64
4.9.2	Cultura de células	64
4.9.2.1	Avaliação da citotoxicidade celular	65
4.9.3	Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue	65
4.9.4	Avaliação da atividade hemolítica em tubos.....	66
4.9.4.1	Operações preliminares	66
4.9.4.2	Teste principal	67
4.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	67
4.10.1	Doseamento de polifenóis pelo método Folin Ciocalteau	68
4.10.2	Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio	68
4.10.3	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH	69
4.10.4	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – ensaio TBARS ...	70
4.11	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	71
4.11.1	Animais utilizados	71

4.11.2	Ensaio farmacológico “ <i>in vivo</i> ” realizados na PUC-PR	72
4.11.2.1	Nociceção induzida por injeção intraplantar de formalina 2,5%	72
4.11.2.2	Peritonite induzida por carragenina 1%	73
4.11.3	Ensaio farmacológico “ <i>in vivo</i> ” realizados na UFAM	73
4.11.3.1	Toxicidade aguda	74
4.11.3.2	Teste das contorções abdominais	76
4.11.3.3	Teste da placa quente	76
4.12	Fluxograma para etapas do trabalho	77
4.13	ANÁLISE ESTATÍSTICA	78
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
5.1	Operações preliminares	78
5.1.1	Determinação do rendimento	78
5.1.2	Determinação do teor de cinzas e umidades	79
5.1.3	teor de sólidos	79
5.1.4	Extração	79
5.2	Prospecção fitoquímica preliminar	80
5.3	IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS	83
5.3.1	Cromatografia em coluna	83
5.3.2	Elucidação estrutural	84
5.3.2.1	Cromatografia líquida de alta eficiência	84
5.3.2.2	Ressonância Magnética Nuclear.....	90
5.3.2.2.1	RMN ¹ H – Substância 1	90
5.3.2.2.2	RMN ¹³ C	92
5.4	AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE	96
5.4.1	<i>Artemia salina</i>	96

5.4.2	Cultura de células	96
5.4.3	Atividade hemolítica	100
5.5	Avaliação da atividade antioxidante	103
5.5.1	Determinação do teor de fenólicos totais – Folin Ciocalteu	105
5.5.2	Ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio	105
5.5.3	Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH	107
5.5.4	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS.....	109
5.6	ENSAIOS FARMACOLÓGICOS	112
5.6.1	Nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina 2,5 %	112
5.6.2	Peritonite induzida por carragenina 1%	114
5.6.3	Determinação do extravasamento de proteínas no exsudato peritoneal	116
5.6.4	Ensaio Farmacológicos realizados na Universidade Federal do Amazonas - UFAM	118
5.6.4.1	Toxicidade aguda	119
5.6.4.2	Ensaio das contorções abdominais	120
5.6.4.3	Ensaio da placa quente	121
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	125
8	CONCLUSÃO	128
	REFERÊNCIAS	129
	ANEXOS	141

1 INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais com finalidades terapêuticas é uma das práticas medicinais mais antigas da humanidade. Apesar da enorme evolução da medicina alopática, a população carente com baixo acesso aos programas de saúde e dificuldade na obtenção de exames e medicamentos, faz intenso uso das plantas medicinais (JUNIOR; PINTO, 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde – OMS, 80% das pessoas dos países em desenvolvimento tem na medicina tradicional seu único apoio, sendo 85% da medicina tradicional o uso de extrato de plantas (JUNIOR; PINTO, 2005). Nesse sentido, o interesse acadêmico pelo conhecimento popular do uso de espécies vegetais tem crescido. Muitas espécies vegetais já tiveram suas propriedades químicas e farmacológicas comprovadas cientificamente a partir do uso tradicional, trazendo à sociedade novas alternativas de fitofármacos assim como disponibilizando à indústria farmacêutica possíveis protótipos de medicamentos. O estudo de novas espécies permite ainda, abranger não somente a lucratividade na produção de fitofármacos, mas também a viabilidade ecológica e a preservação do ecossistema, permitindo que sejam pensadas estratégias de consumo sustentáveis em longo prazo (AMOROZO, 2002).

Assim, é possível pensar na aplicação de conhecimentos locais como uma ferramenta, deixando para trás a subestimação do conhecimento popular vivida antes, pensando em uma ciência que priorize as necessidades locais da sociedade e da comunidade científica (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

A Amazônia, com sua enorme biodiversidade, apresenta grande potencial no fornecimento de compostos nutricionais (SILVA *et al.*, 2007).

A pesquisa das diversas espécies presentes na flora amazônica, muitas vezes ainda não estudadas, pode fornecer moléculas com atividades biológicas interessantes, promover o uso sustentável e a manutenção da biodiversidade. Nesse sentido, é grande o interesse nas espécies vegetais oriundas da região amazônica, seja pela biodiversidade presente no local, seja pelo conhecimento tradicional acumulado pela população.

Um bom exemplo de gêneros com espécies interessantes quimicamente e farmacologicamente presente na região Amazônica é o gênero *Byrsonima*.

Baseando-se nos dados da literatura acerca do gênero *Byrsonima*, e no uso popular para a cura de processos inflamatórios, realizada com outras espécies do mesmo gênero no Amazonas, a espécie *Byrsonima duckeana* A. W. Anderson foi escolhida para tema da presente pesquisa.

A espécie *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson, está presente na cidade de Manaus, no Instituto de Pesquisas da Amazônia - INPA na Reserva Ducke, Trata-se de uma espécie ainda não estudada sob o ponto de vista químico e farmacológico.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar estudo de atividades biológicas e farmacológicas do extrato bruto e frações de *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson *in vivo* e *in vitro* nos modelos de atividades antioxidante, citotóxica (*in vitro*), anti-inflamatória, analgésica e de toxicidade (*in vivo*), assim como delinear o perfil fitoquímico da espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o Extrato etanólico e as frações Hexano, Clorofórmio, Acetato de Etila e Fração Remanescente através de fracionamento em aparelho Soxhlet modificado.
- Realizar prospecção fitoquímica do extrato bruto, a fim de conhecer os principais metabólitos secundários presentes na espécie.
- Obter perfil cromatográfico em Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE do extrato bruto e frações das folhas de *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson.
- Avaliar a toxicidade do extrato, e respectivas frações nos ensaios de toxicidade em *Artemia salina*, atividade hemolítica, toxicidade aguda e cultura de células.
- Realizar doseamento de polifenóis através do ensaio Folin Ciocalteu.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato bruto e frações nos modelos de redução do complexo fosfomolibdênio, redução do radical DPPH e substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico.
- Realizar ensaios farmacológicos *in vivo* nos modelos de dor e inflamação com extrato bruto e frações nos modelos de formalina,

peritonite induzida por carragenina, contorções abdominais e no ensaio da placa quente.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 O REINO VEGETAL COMO FONTE DE NOVAS SUBSTÂNCIAS

A busca por alívio e cura das doenças é uma prática antiga de relação do homem com a natureza e talvez tenha sido uma das primeiras formas de uso dos recursos naturais (VEIGA JR ; BOLZANI,2006).

As primeiras civilizações perceberam que algumas plantas eram possuidoras de princípios que poderiam ser utilizados no combate às doenças (BADKER *et al.*, 2011), há relatos que provam a existência deste vínculo desde as épocas mais remotas (MACIEL, 2002).

Desta forma, durante muito tempo as plantas foram o único recurso para o tratamento das famílias (BADKER *et al.*, 2011), o que faz pensar no imenso conhecimento acumulado acerca da utilização de espécies, pelos povos através do anos.

Os povos primitivos e indígenas com seu profundo conhecimento da natureza contribuíram de modo significativo para o conhecimento da química medicinal moderna acerca de substâncias tóxicas e medicamentosas. A relação com esses povos trouxe avanços e contribuições para a química de produtos naturais e forneceu modelos moleculares para a síntese orgânica clássica (VEIGA JR, BOLZANI, 2006).

Muitos são os exemplos de fármacos desenvolvidos a partir do estudo de plantas medicinais, a saber, os curares utilizados pelos índios para envenenamento de caças em suas flechas, que eram derivados de misturas de espécies vegetais, de onde se isolou a (+) – tubocurarina, e posteriormente se isolou a (-) curina. As atividades farmacológicas do “curare” foram posteriormente estudadas, como sua ação bloqueadora neuromuscular, e a partir daí, iniciou-se os estudos de estrutura atividade (VEIGA JR, BOLZANI , 2006), hoje fundamentais para o entendimento de mecanismos de ação.

Outro exemplo valioso é o caso da *Papoula somniferum* L. (Papaveraceae), conhecida como Papoula. Desta planta foi extraído o ópio,

cujo componente majoritário é a Morfina, usada no combate a dor. Dela também se extraiu a codeína e mais tarde a Papaverina (Merck). Os alcaloides extraídos do *Catharanthus roseus* G. Don (Apocynaceae) e os taxóides extraídos do *Taxus brevifolia* Nutt (TAXACEAE) e de *Taxus baccata* L., são até hoje utilizados com sucesso no tratamento do câncer (FOGLIO *et al.*, 2006).

Desta forma, muitos são os exemplos bem sucedidos de moléculas isoladas, e substâncias identificadas, medicamentos lançados e estruturas modificadas, tendo como início a busca por atividades descritas pelos povos acerca do uso feito ao longo dos anos das espécies vegetais. Nesse contexto, o Brasil com a vasta biodiversidade que apresenta pode se inserir.

Embora haja estreita relação entre o homem e o reino vegetal, após a década de 60 houve um desinteresse da indústria e dos pesquisadores pela pesquisa com plantas medicinais, por acreditarem já ter sido modificadas e isoladas todas as substâncias possíveis. Entretanto, a partir dos anos 80, com a diversificação de técnicas de isolamento e identificação, renasceu o interesse pelos produtos naturais, e as plantas permaneceram como alternativa para tratamentos no mundo todo, ocorrendo a revalorização de preparações fitoterápicas (TURROLA ; NASCIMENTO, 2006). Atualmente, cerca de 50% dos medicamento prescritos são de origem sintética e 25% de origem vegetal (FOGLIO *et al.*, 2006).

As mudanças econômicas globais influenciaram as pessoas não só em sua saúde, mas no modelo de cuidar também. O uso terapêutico através dos recursos naturais que foi por um período subestimado, hoje tenta legitimar-se, uma vez que se crê que o cuidado através das plantas medicinais, é favorável à saúde humana, desde que de forma, segura, com riscos e benefícios bem definidos. A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), no Sistema Único de Saúde (SUS), tem como objetivo ampliar o uso de plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados a fitoterapia, no contexto do SUS, com segurança e qualidade. Essa política se reforça ainda como o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que visa o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BADKER *et al.*, 2011).

Segundo a Organização Mundial de Saúde - OMS 80% da população mundial utiliza plantas medicinais. No Brasil, a medicina ainda não incorporou

às suas prescrições as plantas medicinais, o que pode se justificar pela ausência de disciplinas nos currículos médicos que ensinem sobre o tema, pelo mercado farmacêutico e pela baixa qualidade das matérias primas brasileiras, o que torna necessário investimento em pesquisa, desenvolvimento e qualidade. A própria OMS reconhece o conhecimento tradicional como um importante instrumento no desenvolvimento de produtos para combater doenças que assolam a população de países em desenvolvimento (FUNARI; FERRO, 2005).

Diante disso, faz-se necessário investimento sério em pesquisas de plantas medicinais. O Brasil, país de grandezas superlativas, no que diz respeito aos recursos naturais, possuidor de áreas pouco estudadas, como a região Amazônica e do cerrado brasileiro rico em espécies vegetais, não pode ficar excluído do mercado farmacêutico. Estudos multidisciplinares devem ser desenvolvidos, em parecerias com universidades, empresas e comunidades, para que as espécies sejam estudadas, moléculas sejam identificadas, novas estruturas químicas sejam desenvolvidas, extratos vegetais sejam padronizados, atividades biológicas relatadas sejam validadas, e em especial, estudos de toxicidade sejam feitos. Assim, pode-se pensar em estratégias conscientes de estudos, que respeitem o saber acumulado e devolva informação a comunidade local. A PNPIC mostra interesse do governo no estudo de espécies vegetais, pois é impossível negar a importância do reino vegetal em fornecer alívio, cura e/ou tratamento das doenças.

3.2 A REGIÃO AMAZÔNICA BRASILEIRA COMO FONTE DE COMPOSTOS DE INTERESSE BIOLÓGICO

A América tropical é conhecida por sua enorme variedade de espécie de vegetais. O Brasil apresenta grande número de espécies ainda não conhecidas que podem fornecer atividades biológicas de interesse (RUFINO *et al.*, 2010).

A Amazônia brasileira compreende uma área de 4 milhões de quilômetros. Já foram registradas 2000 espécies medicinais utilizadas pelos nativos e 1250 espécies aromáticas. Apesar da grandeza da região, ainda há muito a se conhecer a respeito das espécies vegetais presentes no local. Hoje, apenas três espécies aromáticas são exportadas na Amazônia, a saber: favas de cumaru (*Dypterix odorata*), óleo de copaíba (*Copaifera sp.*) e o óleo essencial de pau rosa (*Aniba roseodora ducke*). Assim, produtos utilizados na etnomedicina ocupam uma fatia pequena no contexto econômico, sendo esta uma oportunidade que se apresenta para o desenvolvimento de novos produtos levando em conta um mercado exterior muito interessado nos produtos da floresta tropical (BARATA, 2012).

Assim, a Floresta Amazônica, é uma fonte de recursos econômicos e novas descobertas para o Brasil. Desde os tempos do descobrimento a economia amazônica se baseia na produção de commodities, com produtos em estado bruto ou pequeno grau de industrialização. Falta investimento em pesquisas para transformar conhecimento em capital, uma vez que o desenvolvimento sustentável de produtos da floresta ajuda a preservar o meio ambiente e as comunidades locais. Além de gerar grandes lucros. É possível verificar tal fato com dois exemplos brasileiros bem sucedidos com as indústrias de cosméticos Natura e Chamma da Amazônia, que garantiram grandes lucros nos últimos anos, investindo em parcerias com as comunidades locais e em conceitos de biodiversidade (BARATA, 2012). O exemplo recente do lançamento do primeiro medicamento anti-inflamatório fitoterápico vindo de uma planta medicinal brasileira *Cordia verbenaceae* D.C, desenvolvido em parceria com quatro Universidades brasileiras: a Universidade Federal de Campinas – UNICAMP, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP e Pontifícia Universidade Católica de Campinas – PUC-Campinas, abriu uma perspectiva do Brasil entrar

no excludente mercado farmacêutico, o que faz pensar nas inúmeras possibilidades que podem surgir a partir do estudo de plantas amazônicas.

A grande biodiversidade amazônica é fruto da existência de heterogeneidade ambiental e variabilidade genética. O potencial de uso da biodiversidade está além do uso de plantas para fins ornamentais, está relacionado também ao uso dos componentes genéticos, químicos e biotecnológicos com aplicações na área farmacêutica e/ou cosmética (VIEIRA, 2012). Muitas plantas da flora amazônica são utilizadas na cura de doenças degenerativas e diabetes. O estudo dessas espécies, muitas ricas em polifenóis, pode fornecer novas moléculas antioxidantes ou anti-inflamatórias tão solicitadas nos dias de hoje. Uma vez que a biodiversidade brasileira não é totalmente estudada, há um vasto campo para estudos, o que justifica maior investimento em pesquisas de espécies dessa região.

Vale ressaltar que a maior parte da flora ainda é desconhecida do ponto de vista químico e farmacológico e o vasto conhecimento tradicional é uma realidade maior em países em desenvolvimento (SILVA *et al.*, 2006). Vale ainda lembrar que o Brasil não é rico apenas em sua biodiversidade, mas também em sua cultura e em pessoas que manejam o meio ambiente, podendo oferecer modos de agir de maneira sustentável, gerando trabalho e renda familiar para aqueles que utilizam plantas em seu cotidiano, na culinária, em rituais e em banhos (ELISABETSKY, 2012).

Nesse contexto o conhecimento tradicional torna-se uma ferramenta importante, sendo fontes de novas descobertas.

Assim, o uso tradicional pode ser considerado uma pré-triagem quanto a propriedade terapêutica (SILVA *et al.*, 2006). Não se pode desprezar a importância dessa abordagem no contexto das doenças com fisiopatologia desconhecida, uma vez que essa abordagem pode nos fornecer moléculas com mecanismos de ação totalmente desconhecidos (ELISABETSKY, 2003).

O Brasil então, se apresenta como um país com grande potencial dada sua rica biodiversidade e vasto conhecimento tradicional acumulado. O Ministério do meio ambiente estima que os índios brasileiros dominem a aplicação de 1300 plantas brasileiras, podendo entrar em mercados bilionários como o farmacêutico e de suplementos alimentares, que movimentam cerca de 31 bilhões de dólares. Há, no entanto, que se investir no incentivo às políticas

públicas para a pesquisa e para a indústria nacional, promovendo a interação entre indústrias, universidades e centros de pesquisa, fazendo com que a prospecção ética da biodiversidade agregue ciência e tecnologia a seus produtos sendo uma alternativa para as doenças tropicais e/ou negligenciadas destes países em desenvolvimento e para estimular o crescimento de suas economias (FUNARI; FERRO, 2005).

A enorme biodiversidade da região fornece novos compostos muitos utilizados em chás, sucos, geléias e frutas. O conhecimento tradicional tão rico presente entre índios e caboclos deve portanto, ser visto como uma fonte para descoberta de novas moléculas, medicamentos e de recursos que possam ser aplicados no bem estar. A figura 1 ilustra os biomas brasileiros. A Amazônia chama a atenção pela grandeza do bioma.



FIGURA 1: DISTRIBUIÇÃO DOS BIOMAS BRASILEIROS. DESTAQUE PARA O ENORME BIOMA DA AMAZÔNIA.
FONTE: IBGE, 2014.

3.3 A FAMÍLIA MALPIGHIACEAE

A família Malpighiaceae compreende cerca de 63 gêneros e 1100 espécies. Consiste em árvores, arbustos e lianas. Sua ocorrência é ampla em

regiões tropicais (BENEZAR; PESSONI, 2006). No novo mundo estão presentes 85% das espécies do gênero *Byrsonima* e 25% no velho mundo, sendo 50 % no Brasil (FIGUEREDO *et al.*, 2005).

O nome Malpighiaceae é derivado do gênero *Malpighia* em homenagem ao botânico Marcelo Malpighi (ARAUJO, 2008).

O Brasil apresenta cerca de 32 gêneros dessa família distribuídas em diversas formações vegetais com cerca de 300 espécies. Apresentam consideráveis variações em relação ao seu habitat, morfologia do pólen, cobertura da folha e estruturas do fruto. É possível encontrá-las em florestas densas, savanas esparsas, como o cerrado, e nas margens de rios e de florestas (ARAUJO, 2008), sendo essa família uma das mais bem representadas no cerrado (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

Membros da família apresentam folhas simples, opostas, de margem inteira, e presença de pêlos em forma de "t" (tricomasmalpighiáceos), geralmente presentes pelo menos nos pecíolos ou em partes jovens da maioria das espécies, que macroscopicamente têm um aspecto seríceo (adpresso). Os gêneros arbóreos apresentam também estípulas intrapeciolares, que nas espécies de lianas são em geral caducas ou escondidas pelo indumento. As lianas geralmente apresentam glândulas na base da lâmina ou no pecíolo, uma característica restrita a Malpighiaceae dentre as famílias de lianas com folhas opostas. As flores são facilmente reconhecíveis pela presença de um par de glândulas na base externa de cada uma das 5 sépalas.

A família Malpighiaceae apresenta importância econômica, com destaque para a acerola (*Malpighia glabra*) e os conhecidos muricis (*Byrsonima spp.*), cujo fruto é utilizado puro ou no preparo de geleias, sucos e sorvetes. Além disso, muitas espécies dessa família são utilizadas com finalidade ornamental e medicinal em especial, as espécies dos gêneros *Banisteriopsis*, *Byrsonima* e *Galpimia* (GOMES, 2011).

Atualmente a espécie de Malpighiaceae mais conhecida dos brasileiros é a acerola (*Malpighia glabra*), cuja polpa rica em vitamina C tem sido amplamente comercializada em todo o país.

3.4 A RESERVA ADOLFO DUCKE

A Reserva Florestal Adolpho Ducke encontra-se localizada na Floresta Amazônica. Localiza-se próximo a cidade de Manaus e apresenta cerca de 100 km² (HOPKINS, 2005). A figura 2 mostra a localização geográfica da Reserva Florestal Adolpho Ducke – RFAD.

A reserva foi doada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA pelo governo do estado do Amazonas em 16 de fevereiro de 1963. Em 1972 foi declarada Reserva Biológica (FREIRE e AZEVEDO, 2010).

O nome da Reserva é uma homenagem ao botânico Adolpho Ducke (1875-1969) dada a sua grande contribuição ao estudo da Floresta Amazônica (FREIRE e AZEVEDO, 2010).



FIGURA 2 – LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA FLORA DA RESERVA DUCKE.
NOTA: EM CÍRCULO TRACEJADO ESTÁ INDICADO O LOCAL DA RESERVA INDICADA PELA SIGLA RFAD.
FONTE: FREIRE, 2010

A vegetação principal da reserva é a mata de terra firme, não estão presentes matas de várzeas e igapós (HOPKINS, 2012).

Segundo os pesquisadores do INPA, esta reserva é um dos biomas que apresenta grande diversidade de espécies da fauna e da flora mais bem estudados da Floresta Amazônica Central de terra firme. A reserva Ducke foi objeto de inúmeras pesquisas, com destaque para pesquisa sobre a malária simiana, avaliações limnológicas, inventários de vetores e reservatórios naturais de Leishmaniose e Doença de Chagas (FREIRE; AZEVEDO, 2010).

A reserva foi tema de um guia ilustrado que reuniu as plantas vasculares encontradas nela, obra intitulada “Flora da Reserva Ducke – guia de identificação de plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia central”. Aproximadamente 5000 espécies de plantas lenhosas (árvores, arvoretas e lianas) foram plaqueadas ao longo das trilhas dentro da reserva. O projeto registrou uma diversidade de 2079 espécies, fornecendo uma enorme contribuição ao estudo das espécies amazônicas. Dentre as espécies plaqueadas, está a espécie *Byrsonima duckeana* A.W Anderson, com número 2703, localizada no marco M044, objeto de estudo do presente trabalho.

3.5 O GÊNERO *BYRSONIMA*

O gênero *Byrsonima* apresenta destaque na família Malpighiaceae, compondo o maior gênero da família. Suas espécies são conhecidas popularmente como murici. Está distribuído nos campos cerrados e savanas neotropicais e muitas espécies estão presentes na Amazônia sugerindo que seja aí o seu centro de origem e dispersão (BENEZAR; PESSONI, 2006).

Várias espécies ocorrem no nordeste brasileiro e seus frutos são consumidas como sucos, licores e doces (ARAUJO, 2008), apresentam rápido crescimento, flores vistosas, frutos adocicados e suculentos que atraem aves com utilidade para áreas degradadas (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).

Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina popular como anti-asmáticas, anti febris e no tratamento de infecções cutâneas, conforme descrito na tabela 1. Poucas espécies do gênero *Byrsonima* foram estudadas

quimicamente, embora o gênero seja vasto, haja compostos químicos de interesse e que atividades farmacológicas sejam relatadas popularmente, tais como as disfunções gástricas, infecções cutâneas, picadas de cobra e anti-diarréicos (FIGUEREDO *et al.*, 2005).

Além disso, as espécies do gênero *Byrsonima* têm sido investigadas quanto a sua ação contra micro-organismos, entre diversas espécies de bactérias, enterobactérias, micobactérias, protozoários e fungos com resultados positivos na maioria dos estudos. Outras atividades biológicas como espasmogênica / antiespasmogênica, imunoestimuladora, anti-inflamatória, antihemorrágica, antiglicemiante, antihiperlipidêmica, antiulcerogênica, anti-diarréica e antioxidante também foram investigadas em diferentes espécies (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA, 2011).

É sabido que o estudo da família Malpighiaceae é dificultado pelo grande número de representantes, pela grande variabilidade genética e pelas sinonímias (ARAUJO, 2008).

A tabela 1 indica os principais usos etnofarmacológicos das espécies do gênero *Byrsonima*, a tabela 2 relata os estudos farmacológicos já realizados com espécies do mesmo gênero relacionados com o presente trabalho, e a tabela 3 relata as principais substâncias já isoladas nas espécies. As tabelas 1 e 3 estão presentes no trabalho de Guilhon-Simplicio; Meneses, (2010) intitulado "Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae), publicado na revista Química Nova, a tabela 2 foi feita a partir de dados do mesmo trabalho. As tabelas e dados foram cedidos pela autora e professora da Universidade Federal do Amazonas, Mestre Fernanda Guilhon-Simplicio para compor o presente trabalho.

Tabela 1. Principais usos etnofarmacológicos de espécies de *Byrsonima*

<i>B. crassa</i>	Folha e casca do caule	Antidiarréico, antiemético, anti-inflamatório, diurético, febrífugo, tratamento doenças de pele, gastrites, picadas de cobra, úlceras gástricas e pépticas
<i>B. crassifolia</i>	Folha, casca do caule, fruto e semente	Antiasmático, abortivo, antidiarréico (disenteria), anti-inflamatório, antimalárico, digestivo, diurético, febrífugo, laxativo, tratamento de amenorréia, bronquite, cólicas, dor de dente, indigestão, infecções na pele e mucosas, leucorréia, parasitoses intestinais, perda de apetite, picadas de cobra, resfriados, tosses, para expelir placenta e “apertar dentes frouxos”
<i>B. intermedia</i>	Casca do caule	Tratamento de bronquites e tosses
<i>B. verbascifolia</i>	Folha, casca do caule e casca da raiz	Antidiarréico, antipirético, cicatrizante, laxativo, tratamento de infecções na pele.

Tabela 2. Trabalhos relacionados com a presente pesquisa executados com espécies de *Byrsonima*.

Espécie	Parte utilizada	Atividade	Resultado
<i>B. bucidaefolia</i>	<i>Folha</i>	<i>Antioxidante</i>	<i>Ativo</i>
<i>B. coccolobifolia</i>	<i>Folha</i>	<i>Citotóxica</i>	<i>Inativo (Artemia salina)</i>
<i>B. crassa</i>	Folha	Anti-inflamatória	Ativo (inibição da produção de NO e fator de necrose tumoral α)
		Antiproliferativa	Ativo (inibição da proliferação de células tumorais de mamíferos)
<i>B. crassifolia</i>	Casca do caule	Anti-inflamatória tópica	Ativo
		Antioxidante	Ativo
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>)
	Folha	Antioxidante	Ativo

		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>)
	Fruto	Antioxidante	Ativo
		Tóxica	Inativo (ratos)
	Semente	Antioxidante	Ativo
		Tóxica	Inativo (ratos)
<i>B. gardneriana</i>	Partes aéreas	Antioxidante	Ativo
		Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>)
<i>B. intermedia</i>	Folha	Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>)
<i>B. sericea</i>	Folha	Antioxidante	Ativo
<i>B. verbascifolia</i>	Casca do caule	Citotóxica	Inativo (<i>Artemia salina</i>)
		Citotóxica	<i>Artemia salina</i>

Tabela 3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Byrsonima* (em ordem alfabética)

Espécie	Parte estudada	Substâncias isoladas
<i>B. basiloba</i>	Folha	<p>Ácido gálico</p> <p>Amentoflavona</p> <p>(+)-catequina</p> <p>Galato de metila</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-2''-galoilarabinopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina)</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow3)-O-[α-L-rhamnopiranosil-(1\rightarrow6)]-β-D-alopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-ramnopiranosil-(1\rightarrow6)-β-D-galactopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilgalactopiranosídeo</p>
<i>B. bucidaefolia</i>	Folha	<p>Galato de metila</p> <p><i>m</i>-trigalato de metila</p>
<i>B. crassa</i>	Folha	<p>Ácido 3-O-galoil-quínico</p> <p>Ácido 3,4-O-digaloil-quínico</p> <p>Ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico</p> <p>Ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico</p> <p>Amentoflavona</p> <p>(+)-catequina</p>

		<p>(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina</p> <p>(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina</p> <p>(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina</p> <p>(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina-[4α→8]-(+)-catequina</p> <p>3-O-galoil-(+)-catequina</p>
B. crassa	Folha	<p>3-O-galoil-(+)-catequina-[4α→8]-3-O-galoil-(+)-catequina</p> <p>(-)-epicatequina</p> <p>Galato de (-)-epigalocatequina</p> <p>Galato de metila</p> <p>Quercetina</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-2"-galoilarabinopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina)</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-2"-galoilgalactopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina)</p>
	Casca do caule	<p>β-amirina</p> <p>Friedelina</p>
B. crassifolia	Casca do caule	<p>3-O-galoil-(+)-epicatequina</p> <p>3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4α→8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina</p> <p>3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4α→8]-3-O-galoil-(+)-epicatequina-[4α→8]-(+)-</p>

		<p>epicatequina</p> <p>3-O-galoil(-)-epicatequina-[4β→8]-3-O-galoil(+)-epicatequina-[4α→8]-(+)-epicatequina</p> <p>3-O-galoil(+)-epicatequina-[4α→8]-(+)-epicatequina</p> <p>Ácido gálico</p> <p>(+)-catequina</p> <p>(+)-epicatequina</p> <p>(+)-epicatequina-[4α→6]-(+)-epicatequina</p> <p>(+)-epicatequina-[4α→8]-(+)-epicatequina</p> <p>(+)-epicatequina-[4α→8]- 3-O-galoil(+)-epicatequina</p>
<p>B. <i>crassifolia</i></p>	<p>Folha</p>	<p>β-sitosterol</p> <p>1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(β-D-glicopiranosil)-glicerol</p> <p>1,2-di-O-(8-hexadecenoil)-3-O-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol</p> <p>1,2-di-O-hexadecanoil-3-O-(β-D-glicopiranosil)-glicerol</p> <p>1,2-di-O-tetradecanoil-3-O-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol</p> <p>1,2-di-O-hexadecanoil-3-O-(6-sulfo-α-D-quinovopiranosil)-glicerol</p> <p>2-β-hidróxi-lupeol</p> <p>Ácido aspártico</p> <p>Ácido betulínico</p> <p>Ácido 2-α-hidróxi-oleanólico</p>

		<p>Ácido 2-β-hidróxi-oleanólico</p> <p>Ácido 5-hidróxi-pipecólico</p> <p>Ácido oleanólico</p> <p>Ácido pipecólico</p> <p>Betulina</p> <p>Betulinaldeído</p> <p>D-alanina</p> <p>Daucosterol</p> <p>Galato de metila</p> <p>Lupeol</p> <p>Quercetina</p>
<i>B. crassifolia</i>	Folha	<p>Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina)</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-6"-galoilgalactopiranosídeo</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina)</p> <p>Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (isoquercetina)</p> <p>Prolina</p> <p>Ursenaldeído</p> <p>Valina</p>
<i>B. fagifolia</i>	Folha	<p>Acetato de α-amirina</p> <p>Ácido bássico</p> <p>Ácido gálico</p>

		<p>Ácido 3-O-galoil-quínico Ácido 3,4-O-digaloil-quínico Ácido 3,4,5-O-trigaloil-quínico Ácido 1,3,4,5-O-tetragaloil-quínico Dotriacontano Galato de metila Lupeol Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilgalactopiranosídeo Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilglicopiranosídeo Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo (isoquercetina) Quercetina-3-O-β-D-xilopiranosídeo</p>
B. intermedia	Folha	<p>Ácido gálico Amentoflavona Galato de metila Quercetina Quercetina-3-O-α-L-2''-galoilarabinopiranosídeo Quercetina-3-O-α-L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) Quercetina-3-O-β-D-2''-galoilgalactopiranosídeo Quercetina-3-O-β-D-galactopiranosídeo (hiperina)</p>
	Raiz	<p>β-amirina Ácido gálico</p>

		1,2-benzenodiol (catecol, pirocatecol, pirocatequina) 1,2,3-benzenotriol (pirogalol, ácido pirogálico)
	Flor	Ácido (3R, 7R)-3,7-diacetóxi-docosanóico (ácido birsônico)
<i>B. microphylla</i>	Folha	Galato de metila Quercetina
	Madeira	β -amirina Δ^1 -lupenona 3,5-dicloro-6-(6-hidróxi-4-metóxi-3-metóxicarbonil-2-metil-fenóxi)-2-hidróxi-4-metil-benzoato 3,7-dihidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-7,8-dihidro-6H-antraceno-1,4,5-triona (2S, 3S)-3'-hidróxi-5,7,4'-trimetóxi-flavan-3-ol (2S*, 10aR*)-2,8-dihidróxi-6-metóxi-1,1,7-trimetil-2,3,10,10a-tetrahidro-1-H-fenatreno-9-ona
<i>B. microphylla</i>	Madeira	3-hidróxi-2-metóxi-8,8,10-trimetil-8H-antraceno-1,4,5-triona Betulina Lupeol
<i>B. variabilis</i>	Flor	3-O- β -D-glicopiranosil-3', 4', 5, 7 – tetrahidroxiflavanona 3', 4', 5, 7 – tetrahidroxiflavanona Galato de etila

B. <i>verbascifolia</i>	Casca do caule	β -amirina β -amirirona β -sitosterol 3-O-acetil-lupeol Ácido 3-O-acetil-oleanólico Friedelina
	Folha	α -amirina Ácido oleanólico Ácido ursólico Quercetina Quercetina-3-O- α -L-arabinopiranosídeo (guaijaverina) Quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo (isoquercetina)

(FONTE: GUILHON-SIMPLICIO; MENESES; 2010)

3.6 *BYRSONIMA DUCKEANA* W.R ANDERSON

As espécies do gênero *Byrsonima* são facilmente encontradas na cidade de Manaus e em todo o Estado do Amazonas. São atribuídas às cascas e as folhas das árvores atividades anti-inflamatórias. No entanto, nem todas as espécies foram estudadas até o momento, e as mesmas são comumente confundidas pelos locais.

As espécies de *Byrsonima* presentes na região Amazônica brasileira são comumente chamadas de muricis e de sara-tudo. Na cidade de Manaus a espécie *B. duckeana* é encontrada na Reserva Adolpho Ducke – Reserva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA. Tendo como base o uso popular feito com espécies do gênero *Byrsonima* e estudos realizados com espécies do gênero que apresentaram atividades biológicas de grande interesse farmacológico e econômico somado a riqueza de metabólitos secundários no gênero, a espécie *Byrsonima duckeana* foi selecionada como objeto de estudo da presente pesquisa, tendo como objetivo caracterizar química e farmacologicamente o extrato etanólico e frações.

Byrsonima duckeana W. R. Anderson é uma árvore de dossel. Apresenta pecíolo, ramos e face inferior da folha com pelos ramificados e diminutos e ferrugíneos. É a espécie com folha maior, sendo frequentes nervuras secundárias maior que 10 pares (VICENTINI; ANDERSON, 1999).

A figura 3, retrata a distribuição da espécie *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson ao longo do Brasil. A espécie é endêmica no Brasil, com distribuição geográfica pelo Amazonas e Pará.



FIGURA 3- DISTRIBUIÇÃO DA ESPÉCIE *BYRSONIMA DUCKEANA* W.R. ANDERSON NO BRASIL
FONTE: MAMEDE; 2012

Diante da importância do estudo de espécies vegetais, da estreita relação do reino vegetal e da humanidade, da lacuna farmacológica ainda existente pela falta de novas fontes de moléculas com atividades biológicas diversas, este estudo se desenvolveu buscando conhecer a espécie *Byrsonima duckeana* W.R Anderson do ponto de vista químico, biológico e farmacológico. A atividade antioxidante, inibitória da dor e inflamação, citotóxica, bem como o perfil toxicológico da espécie foram alvos de estudo desta pesquisa, dada a necessidade de substâncias que atuem nestes alvos farmacológicos e os relatos encontrados no gênero *Byrsonima*. A seguir, a revisão da literatura elucida a importância destas atividades biológicas elencadas no presente trabalho.

3.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radicais livres são produzidos todos os dias nas vias metabólicas. O processo oxidativo é essencial à vida estando envolvidos na produção de energia, fagocitose, sinalização celular e síntese de substâncias. Porém, o excesso de radicais livres é danoso ao DNA, aos lipídeos de membrana e às proteínas, sendo responsáveis pelo desenvolvimento de diversas patologias, tais como artrite, catarata, câncer, envelhecimento, doenças cardiovasculares, disfunções cerebrais e declínio do sistema imune (MORAIS *et al.*, 2009).

Diante da diversidade de doenças causadas por radicais livres e do grande número de pessoas que desenvolveu tais doenças, em especial nos últimos anos, atualmente é grande a busca por substâncias antioxidantes (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Vale lembrar que antioxidante é qualquer substância capaz de, em baixa concentração quando comparada ao substrato oxidável, o regenerar ou prevenir sua oxidação. Sendo assim, essas substâncias apresentam ampla aplicação na indústria nos mais variados campos desde o farmacêutico ao alimentar (ANDRADE *et al.*, 2007).

Basicamente, os antioxidantes são divididos em duas classes: os antioxidantes primários e os antioxidantes secundários. Os antioxidantes primários são aqueles que inibem ou retardam a oxidação, inativando os radicais por doar átomo de hidrogênio ou elétrons, transformando o radical em uma substância estável. Os antioxidantes secundários apresentam variados mecanismos de ação, alguns se ligam a íons metálicos, inativas as EROS (espécies reativas de oxigênio), convertem hidroperóxidos em espécies não radicalares ou através de absorção de radiação U.V (ANDRADE *et al.*, 2007).

A busca por substâncias antioxidantes é um desafio da indústria nos últimos anos. Além de fármacos atuantes nas mais diversas doenças e moléculas que atuem na prevenção do envelhecimento celular, a indústria alimentícia necessita de inibidores da rancificação e da perda de aromas que levam a grandes prejuízos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Tal preocupação está intimamente relacionada à inibição da oxidação de lipídeos, que retarda a formação de produtos tóxicos, mantém a qualidade sensorial e nutricional e aumenta a vida de prateleira desses produtos (SILVA *et al.*, 2010).

Em função dos possíveis problemas dos produtos antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm buscado fontes naturais que possam substituir ou se associar aos sintéticos já existentes (OLIVEIRA *et al.*; 2009).

Assim, antioxidantes naturais tem atraído interesse em estudos por sua seguridade e potencial terapêutico. Além disso, constituem uma alternativa ecologicamente correta, uma vez que os produtos não aproveitados da indústria alimentícia, como cascas e sementes são boas fontes para extração de compostos antioxidantes (NUNES, 2011), somada a boa aceitação dos antioxidantes naturais vêm sendo melhor aceito pelos consumidores e muitos apresentam maior atividade que os sintéticos (SILVA *et al.*, 2010).

No ramo da alimentação, hoje é preconizada a suplementação alimentar com componentes que sejam fontes de antioxidantes tais como ervas com alta concentração de compostos capazes de inibir ou desativar as cascatas oxidativas, além de hábitos de vida saudáveis. Apesar dos diversos mecanismos do corpo humano para driblar o estresse oxidativo, sabe-se que os antioxidantes exógenos contribuem para a resistência aos danos do estresse oxidativo (HASSIMOTO *et al.*, 2005; ANDRADE *et al.*, 2007).

Sendo assim, os produtos naturais, podem fornecer substâncias com grande potencial antioxidante. Investir na área de pesquisa em substâncias com atividade antioxidante é necessário e promissor uma vez que há um mercado havido por novos produtos que possam inibir ou retardar os danos causados pelo estresse oxidativo, incluindo processos como a inflamação e a dor.

3.8 INFLAMAÇÃO E DOR

A sobrevivência na terra está intimamente relacionada a capacidade do corpo humano em se defender dos ataques e injúrias (TRACEY, 2002).

O processo inflamatório está relacionado ao início de uma resposta contra a entrada de um invasor. A partir daí, uma série de reações são deflagradas, com expedição de células, morte de microrganismos e células hospedeiras que estão infectadas, liquefação do tecido circundante evitando metástase microbiana e cura dos tecidos danificados por trauma ou pela resposta do hospedeiro (NATHAN,2002).

Assim que o invasor entra no corpo humano, o sistema imune dispara uma discreta resposta inflamatória, garantindo assim a defesa do organismo. A magnitude da resposta inflamatória é crucial. Caso a resposta seja insuficiente, tem-se o quadro da imunodeficiência, que pode gerar câncer e infecção. Respostas excessivas estão relacionadas aos quadros de doenças auto-imunes. Casos onde a inflamação chega a corrente sanguínea deflagram quadros de sepse. Assim, a resposta inflamatória deve ser limitada, redundante, rápida, reversível, localizada e integrada ao sistema nervoso, garantindo a homeostase (TRACEY, 2002).

Baseando-se na definição de Celsus para os sintomas da inflamação, como “*rubor, calor, dolor, tumor*”, em muitas doenças de causas desconhecidas, vale controlar a inflamação, uma vez que por vezes, a inflamação pode ser mais danosa do que o microrganismo invasor (NATHAN, 2002).

Assim, a inflamação é uma resposta adaptativa iniciada por um estímulo como infecção ou injúria (MEDZHITOV, 2008). No entanto, processos crônicos inflamatórios, são foco de pesquisas por estarem relacionados com as doenças da atualidade.

Doenças auto-imunes, doenças crônicas como Diabetes tipo 2 e doenças cardiovasculares, estão relacionadas a processos inflamatórios não agudos e com mecanismos ainda não definidos. Seu processo inflamatório não está relacionado a clássica explicação para o quadro agudo, com invasão e início da resposta contra o invasor, estão sim, por sua vez, associada a mal função do tecido, sem se relacionar diretamente a defesa do invasor (MEDZHITOV, 2008).

Seja qual for a causa, a inflamação é um processo adaptativo relacionado a garantir a hemostasia (MEDZHITOV, 2008), por isso, trata-se de um importante processo fisiológico.

Reações inflamatórias agudas relacionadas a agentes infecciosos invasores, se iniciam com o recrutamento celular ao sítio da lesão. O reconhecimento inicial é feito por células residentes do tipo macrófagos e mastócitos que produzem

mediadores da inflamação como citocinas, quimiocinas, aminas vasoativas eicosanoides e produtos da cascata proteolítica, que levam a exsudação local de plasmas, proteínas e leucócitos que em geral tem acesso apenas aos vasos sanguíneos e agora chegarão ao sitio inflamatório. Os neutrófilos chegam ao local e matam o invasor lançando sobre eles o conteúdo tóxico de seus grânulos, onde se encontram as Espécies Reativas de Oxigênio – EROS e as NOS e outras substâncias (MEDZHITOV, 2008), o que relaciona os processos oxidativos e inflamatórios.

Uma vez disparado, o processo inflamatório envolve recrutamento celular e liberação de substâncias, como citocinas, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, fatores de transcrição gênica, mediadores da inflamação, promovem conjuntamente alteração na transdução periférica do estímulo nociceptivo, aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores de elevado limiar. Além disso, a estimulação dos nociceptores de aferentes primários, produz reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídios contribuindo para uma maior estimulação do processo inflamatório e da hiperalgesia (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Uma resposta satisfatória, inclui a eliminação do agente invasor, seguida de reparo tecidual e interrupção da resposta inflamatória. Nas doenças auto-imunes e nos quadros de inflamação crônica, esse efeito final, com interrupção da resposta não ocorre. Os mecanismos da doença crônica inflamatória são pobremente conhecidos (MEDZHITOV, 2008).

Controlar os efeitos da inflamação nos processos agudos, ou mesmo controlar a inflamação naquelas doenças onde o mecanismo das mesmas ainda não está definido é de suma importância, haja visto o grande impacto social que os sintomas da inflamação causam.

É estimado que o tratamento da dor crônica, por exemplo, gerada a partir da dor aguda pode chegar a mais de 1 milhão de dólares em 30 anos de tratamento (NUCCI *et al.*, 2012).

A dor, é ainda uma das maiores causas de busca ao auxílio médico. Estima-se que 80% da população mundial busque auxílio médico em relação a dor. A dor é a principal causa de absenteísmo, licenças médicas, aposentadorias precoces, indenizações trabalhistas e baixa produtividade, sendo portanto, um problema de saúde pública (RUVIARO; FILIPPIN, 2012).

Neste sentido, controlar os processos inflamatórios e aliviar a dor dos pacientes é de suma importância.

Assim, a dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão.

Atualmente, diante do grande campo de estudo que é a dor, pode-se classificar a dor segundo o tipo de lesão e/ou os mediadores envolvidos. Quando há estímulo excessivo de nociceptores chamamos o processo de dor de dor nociceptiva. Quando há lesão do tecido neuronal chamamos então de dor neurogênica. Já a dor neuropática ocorre por disfunção de um nervo e a psicogênica está associada a fatores psicológicos (PERAZA-SÁNCHEZ *et al.*, 2007).

Desta forma, o sistema nervoso sensorial é capaz de perceber e reagir a estímulos externos, diferenciando estímulos inócuos dos agressores pela expressão de proteínas transdutoras. As histórias de trauma, as infecções virais, as doenças vasculares, os distúrbios endócrinos e metabólicos, a deficiência nutricional e os processos inflamatórios contribuem para a estimulação do sistema nervoso, alterando a expressão de canais iônicos, modificando a expressão de receptores, alterando a distribuição de neurotransmissores e neuromediadores, permitindo que neurônios atinjam mais rapidamente o limiar de despolarização (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

Percebe-se então, que os mecanismos fisiológicos da dor estão relacionados com conceitos de sensibilização periférica e neuroplasticidade, com ação por mediadores bioquímicos nas vias nociceptivas. Desta feita, inflamação, dor e fatores psicológicos estão intimamente relacionados (PAIVA *et al.*, 2006).

O conhecimento da fisiopatologia da dor permite pensar em fármacos analgésicos modernos, que inibam a produção e ou liberação do mediador, ou promovam bloqueio de receptores ativados, ou ainda inibam as enzimas envolvidas na síntese dos mediadores inflamatórios como a Cicloxigenase-2 (COX-2) e a Fosfolipase A₂. Além disso, os inibidores COX-1 e os inibidores COX-2 seletivos são largamente utilizados para tratamento da dor, inflamação e febre (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

Portanto, o tratamento da dor deve se basear na etiologia e fisiopatologia da dor e nas suas repercussões. Desta maneira, o uso de fármacos analgésicos e

substâncias capazes de diminuir a condução inflamatória são utilizados no tratamento da dor, visando melhorar a qualidade de vida do paciente (VITOR *et al.*, 2008).

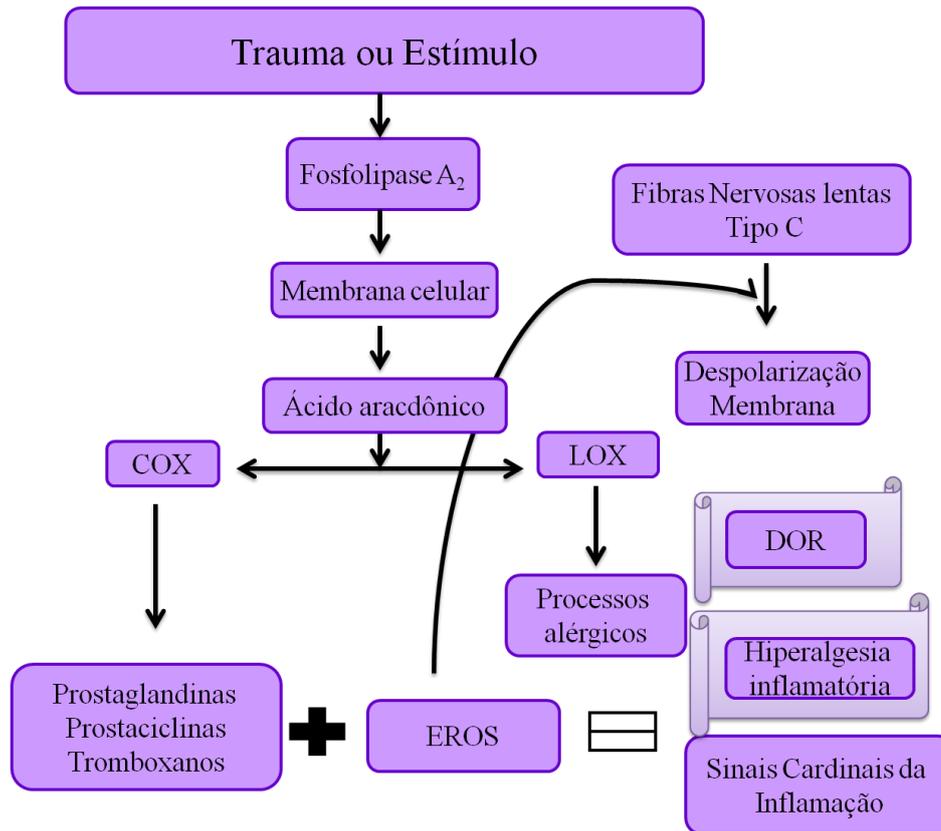


FIGURA 4 – ESQUEMA GERAL DO PROCESSO DE DESENVOLVIMENTO DA DOR E HIPERALGESIA INFLAMATÓRIA
 FONTE: O AUTOR, 2014.

A alta prevalência de dor, seja ela nos processos agudos ou crônicos, indica que deve-se pensar em alternativas, uma vez que o processo de dor, pode restringir as atividades do indivíduo (HAEFFNER *et al.*, 2012).

As terapias complementares, hoje apoiadas pela Organização Mundial de Saúde – OMS e pelo Governo Brasileiro, através da implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), no Sistema Único de Saúde –SUS, incluem o uso de plantas medicinais para prevenção de agravos, promoção e recuperação da saúde (HAEFFNER *et al.*, 2012).

Nesse sentido, o estudo de plantas medicinais é de grande valia, uma vez que as plantas medicinais, são utilizadas pelas populações ao longo da história, por serem de fácil acesso e serem economicamente viáveis.

Muitas são as espécies vegetais utilizadas no Brasil para cura de processos inflamatórios, tais como a aroeira-do-sertão, *Myracrodruon urundeuva* Fr, ALL, da família Anacardiaceae, utilizada no nordeste (ALBUQUERQUE; RODRIGUES; VIANA, 2004), o confrei, *Symphytum officinale*, membro da família Borraginaceae (RITTER *et al.*, 2002), a calêndula, *Calendula officinales* pertencente a família das Compostas (BALDUCCI-ROSLINDO; SILVIO; MALAGOLI, 1999).

As virtudes terapêuticas dos vegetais são em geral descritas por observações populares onde as informações foram acumuladas durante séculos (MACIEL *et al.*, 2002), o conhecimento tradicional do uso de espécies vegetais medicinais funciona como um filtro para a indústria gerando inovações ou sugerindo atividades (REZENDE; RIBEIRO, 2005), já que os produtos naturais vêm sendo reconhecidos como uma importante fonte de medicamentos efetivos terapêuticamente (BARBOSA-FILHO *et al.*, 2006).

A importância dos produtos naturais para a terapêutica atual parece inestimável. Moléculas naturais tem sido base do surgimento de moléculas protótipo, auxiliando no desenvolvimento de novos fármacos, além de fornecerem ferramentas importantes no estudo de farmacologia, fisiologia e bioquímica (RATES, 2001).

É importante ressaltar que as plantas produzem substâncias químicas assim como outros seres vivos que podem sim, atuar de maneira benéfica sobre os seres vivos e também de forma tóxica, sendo por isso necessário o estudo químico, farmacológico e toxicológico para que seu uso seja seguro, em especial das plantas nativas brasileiras, dada a ampla utilização de espécies ditas medicinais (RITTER *et al.*, 2002).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OPERAÇÕES PRELIMINARES

4.1.1 Coleta do material botânico

O material botânico utilizado neste trabalho foram folhas de *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson, conforme ilustrado na figura 5.

As folhas da espécie foram coletadas no estado do Amazonas, no município de Manaus, na Reserva Florestal do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA – Reserva Florestal Adolpho Ducke, no dia 13 de novembro de 2010 as 09h 15 min, pelo mateiro Everaldo da Costa Pereira.

A espécie foi identificada por Alberto Vicentini e W.R. Anderson no contexto do projeto “Flora da Reserva Ducke”, e está depositada no museu botânico do INPA, exsicata número 179696, coleta de marco 2703, conforme figura 6 e 7.



FIGURA 5. FIGURA ILUSTRATIVA DO DEPÓSITO DE EXSICATAS DE *BYRSONIMA DUCKEANA* NO HERBÁRIO DO INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA DESTAQUE PARA COLETA DO MARCO 2703. FONTE: ACERVO PESSOAL DE GUILHON-SIMPLICIO, 2010.



FIGURA 6. NUMERAÇÃO DE *BYRSONIMA DUKEANA* W.R. ANDERSON NA RESERVA DUCKE
FONTE: ACERVO PESSOAL DE FERNANDA GUILHON – SIMPLICIO, 2010.

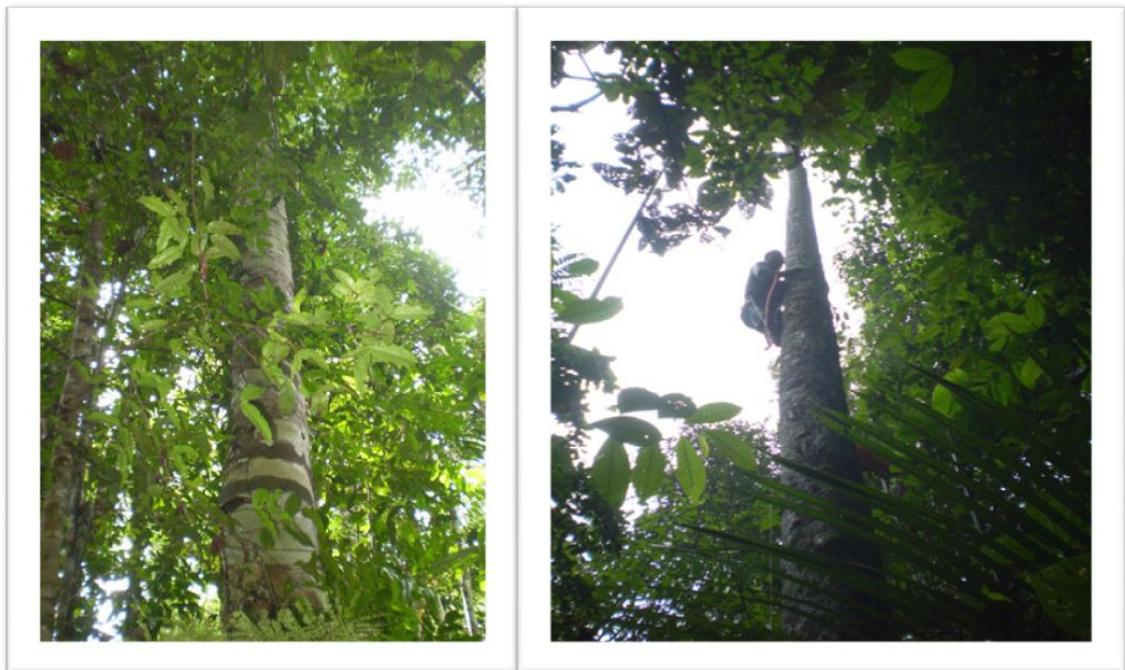


FIGURA 7- FOTOGRAFIA DA ESPÉCIE NO LOCAL DA COLETA
FONTE: ACERVO PESSOAL DE FERNANDA GUILHON – SIMPLICIO, 2010.

4.1.2 Conservação da matéria prima vegetal

Após coletada a amostra foi seca a temperatura ambiente por sete dias e então encaminhada ao Laboratório de Farmacotécnica da Universidade Federal do Paraná – UFPR. Em seguida a amostra foi levada a estufa com circulação de ar interna, a 40 °C, onde as folhas foram secas e foram separados folhas de galhos. As folhas foram moídas em moinhos de facas e martelos, dando origem a matéria-prima vegetal (MPV). Em seguida o material foi conservado ao abrigo da luz até ser submetido à extração.

4.2 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE CINZAS E UMIDADE

O material vegetal foi pesado em cadinho (calcinado, resfriado e pesado), incinerado até eliminação do carvão (não ultrapassando 600°C) em mufla e resfriado em dessecador. Realizou-se a pesagem e foi calculada a porcentagem de cinzas em relação ao material vegetal seco ao ar (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA PRELIMINAR

As análises fitoquímicas realizadas estão de acordo com Moreira (1979), com adaptações.

4.3.1 Metabólitos solúveis em álcool

Foi preparado extrato hidroalcoólico 20% por maceração, partindo de 40 gramas de material vegetal seco e moído em 200 mL de álcool etílico 70%. O extrato foi preparado, em banho-maria por 1 hora e foi filtrado, tendo seu volume completado para 200 mL. As frações foram utilizadas para a pesquisa de glicosídeos flavônicos, alcalóides, esteróides e/ou triterpenos, cumarinas.

4.3.1.1 Pesquisa de alcalóides

De cada fração foi retirada amostra de 50 mL, e levada à secura em banho-maria a 50 °C. Ao resíduo foram acrescentados 1 mL de etanol e 20 mL de HCl 1%. Para cada fração foram utilizados cinco tubos de ensaio, referentes aos reativos empregados: Reativo de Mayer (Mercúrio Tetraiodeto de Potássio), Reativo de Dragendorff (Tetraiodeto Bismuto de Potássio), Reativo de Bertrand (Ácido Sílico Túngico) e Reativo de Bouchardat. Em cada tubo foram acrescentados 2 mL de cada fração e duas gotas de cada reativo. Um tubo para cada fração contendo apenas o extrato para servir de controle negativo do teste foi reservado.

A reação foi considerada positiva de acordo com a formação de precipitados de coloração característica conforme descrito no quadro 1 a seguir.

Reagente	Coloração
Mayer	Precipitado branco ou leve turvação branca
Dragendorff	Precipitado cor de tijolo
Bouchardat	Precipitado de coloração alaranjada
Bertrand	Precipitado branco ou leve turvação branca

QUADRO 1 – AVALIAÇÃO DE RESULTADOS EM TESTES PARA DETECÇÃO DE ALCALÓIDES

4.3.1.2 Pesquisa de leucoantocianidinas

Foram levados à secura 5 mL das frações e solubilizadas em 5 mL de etanol, adicionando em seguida 5 gotas de HCl concentrado. O conjunto foi levado à ebulição. O desenvolvimento de coloração caracteriza a positividade do teste.

4.3.1.3 Pesquisa de heterosídeo flavônico

Foram levados à secura 10 mL de cada fração e solubilizados em 10 mL de etanol. De cada fração 5 ml foram transferidos para tubo de ensaio e adicionados 200 mg de limalha de ferro e gotas de HCl fumegante lentamente. O desenvolvimento de coloração caracteriza a positividade do teste.

4.3.1.4 Pesquisa de flavonóis

A pesquisa de Flavonóis é realizada através da reação de Taubock. Foram levados à secura 10 mL de cada fração e adicionadas 5 gotas de acetona e 30 mg da mistura de ácido bórico e ácido oxálico (1:1). O conjunto foi levado à secura novamente. Ao resíduo foram adicionados 5 ml de acetato de etila. O resultado foi visualizado em câmara com lâmpada ultravioleta, onde o aparecimento de fluorescência é resultado da presença de flavonóis.

4.3.1.5 Pesquisa de esteróides e triterpenos

Foram levados à secura 10 mL de cada fração. Os resíduos foram solubilizados em 5 mL de clorofórmio e filtrados em algodão. Transferiu-se para cada tubo de ensaio 0,1; 0,5 e 1,0 mL de cada fração pesquisada. O volume de cada tubo foi ajustado para 2 mL utilizando clorofórmio. A reação de Liberman-Bouchard foi realizada em cada tubo, adicionando 1 mL de anidrido acético e 2 mL de H₂SO₄ concentrado de maneira lenta.

4.3.2 Preparo do extrato aquoso a 20%

A extração foi realizada em banho-maria a 70°C por 90 minutos utilizando 40 g das folhas de *B. duckeana* triturada em 200 mL de água destilada. O extrato foi filtrado por meio de papel de filtro e volume completado com água destilada até 200 mL. O extrato aquoso foi utilizado para pesquisa de saponinas, cumarinas e taninos.

4.3.2.1 Pesquisa de heterosídeos saponínicos

Agitar vigorosamente 3 tubos com 5 mL do extrato aquoso, energicamente durante 5 minutos. Espuma persistente em um dos tubos indica a presença de saponinas, confirmada pela adição de solução aquosa de ácido clorídrico 1%.

4.3.2.2 Pesquisa de cumarinas

Colocar 3 gotas do extrato aquoso em 2 pontos de um papel de filtro previamente marcado, deixar secar e adicionar 1 gota de hidróxido de sódio 1N em cada mancha. Cobrir uma das manchas com moeda e observar sob luz UV de ondas longas. A fluorescência azul ou verde-amarelada indica reação positiva para cumarinas.

4.3.2.3 Pesquisa de taninos

Para realização da pesquisa de taninos na espécie estudada, foi transferido 1mL de extrato aquoso para três tubos de ensaio e neles foram adicionados os seguintes reagentes, no tubo 1 foram colocadas 3 gotas de cloreto férrico. A reação é considerada positiva para presença de taninos se ocorre coloração azul ou verde, com formação ou não de precipitado.

No tubo 2 foram adicionadas de 1 a 3 gotas de sulfato amoniacal. O surgimento de coloração azul ou verde é indicativo da presença de taninos.

No tubo 3 foram adicionadas 3 gotas de dicromato de potássio 1%. O resultado positivo ocorre quando há o desenvolvimento de precipitado.

4.4 OBTENÇÃO DO EXTRATO BRUTO

O extrato bruto foi obtido por extração das folhas moídas (1.852, 81gramas), por Soxhlet, conforme figura 8, utilizando como solvente etanol (P.A), obtendo extrato bruto etanólico. O extrato bruto foi então particionado com solventes de polaridade crescente em soxhlet modificado segundo Carvalho (2001). A partição foi

realizada com os solventes hexano, clorofórmio, acetato de etila, sempre partindo do resíduo da fração anterior para obtenção da fração seguinte. As frações foram concentradas no próprio aparelho e pesadas para cálculo do rendimento.



FIGURA 8 – APARELHO DE SOXHLET UTILIZADO PARA OBTENÇÃO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO.
FONTE: ACERVO PESSOAL DE CRISTIANE DA SILVA PAULA, 2012.

4.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE SÓLIDOS

O extrato bruto etanólico foi submetido a determinação do teor de sólidos. O volume total de extrato foi medido antes que o mesmo fosse concentrado. 1 mL do extrato foi colocado em placa de *Petri* e levado a secura. A diferença entre o peso da placa vazia e a placa contendo o extrato seca foi realizado e extrapolado para o volume total do extrato fornecendo o dado de teor de sólidos (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.6 IDENTIFICAÇÃO DE CONSTITUINTES QUÍMICOS

A busca pela identificação de substâncias das frações hexânica e acetato de etila foi feita pela solubilização em metanol de cada fração concentrada e incorporada a 6 g de Sílica-gel 60 - Merck®- Art. 7734 – com tamanho de partícula 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM (cerca de uma vez o seu peso seco) para a formação da pastilha de sílica. A pastilha foi submetida à cromatografia líquida em coluna com 30cm de altura por 3 cm de diâmetro, empacotada com 30 g de Sílica-gel 60 (0,063-0,200mm) Merck®. O sistema de solvente empregado oferece gradiente de polaridade crescente. As frações resultantes foram analisadas através de Cromatografia em camada delgada (CCD) e reunidas de acordo com similaridade.

A fração hexano (6,4629 gramas) foi submetida a cromatografia em coluna, utilizando como fase estacionária sílica gel e como fase móvel gradiente hexano e acetato de etila, partindo de 100% de hexano, aumentando 5% de acetato de etila a cada 100 mL de solução. Foram coletados 10 mL de cada fração. A análise em CCD de cada amostra coletada foi realizada utilizando como fase móvel, o sistema de solvente Tolueno:Acetato de etila (93:7) e como revelador vanilina sulfúrica (Etanol: ácido sulfúrico (1:1)).

A coluna 2 foi realizada com a fração acetato de etila. Utilizou-se como gradiente o sistema MeOH:H₂O (70:30). Utilizou-se 6,1510 gramas da amostra para confecção de pastilha. Foram coletadas 10 mL de cada amostra.

4.7 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA – CLAE.

O perfil cromatográfico do extrato bruto, fração clorofórmio e fração acetato de etila, foi delineado através de cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do

laboratório de Fitoquímica do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Paraná. Utilizou-se equipamento Merck Hitach – eliete lachrom, detector (diode array detector) DAD L-2450 coluna RP 18, de 5 micrometros e 4,6x250 nm.

Para isso utilizou-se como fase móvel o sistema ácido fosfórico 0,2 N + ácido sulfúrico 0,02 N metanol como fase A, e como fase B foi utilizado metanol.

O gradiente de concentração utilizado partiu de 95% da fase A chegando a 95% da fase B. A corrida teve duração de 46 minutos com fluxo de 1 mL/min. e a corrida foi monitorada em 300 nm.

Foram injetadas amostras na concentração de 15 mg/ml filtradas previamente em volume de 30 microlitros. O padrão de ácido gálico utilizado estava na concentração de 100 µ/ml.

4.8 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

As substâncias de interesse isoladas da fração hexano foram submetidas as técnicas de elucidação estrutural, a saber, Espectroscopia de Ressonância Magnética nuclear (RMN) unidimensional de ^1H e ^{13}C , com apoio do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear do Departamento de Química da Universidade Federal do Paraná.

4.9 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

As amostras testadas nos modelos de toxicidade *in vitro* foram extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente, exceto no ensaio *Artemia salina* onde a fração acetato de etila não foi verificada. As amostras foram avaliadas frente ao microcrustáceo *Artemia salina*, foi realizada a avaliação da citotoxicidade celular com o ensaio MTT e verificada a atividade hemolítica.

4.9.1 *Artemia salina*

Os ovos de *Artemia salina* obtidos comercialmente, foram colocados para eclosão em água salgada (38 gramas de sal marinho e 1000 mL de água purificada) por 48 horas sob aeração contínua e luz. O pH da solução foi mantido na faixa de 8-9, condição ótima para a viabilidade do microcrustáceo (LEWAN *et al.*, 1992).

Após a eclosão dos ovos 10 náuplios foram transferidas para tubo contendo as substâncias e/ou extrato testado seco e o volume final foi ajustado para 2,5 mL. O controle negativo do teste foi realizado com solvente no qual as amostras foram diluídas, metanol, e o controle positivo foi o sulfato de quinidina. Todos os tubos apresentavam volume final igual, ajustado com água salgada. Após 24 horas foram contabilizados o número de larvas mortas e vivas utilizando lupa e iluminação incandescente.

Os dados foram analisados pelo método de probitos e foi determinada a DL₅₀. Foram consideradas frações ativas aquelas que apresentarem DL₅₀ menor que 1000 ppm.

4.9.2 Cultura de células

As células da linhagem monocítica HT29 e células U937 foram cedidas pela Prof^a Dr^a Andrea Novais Moreno, do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná- (PUCPR). O cultivo foi efetuado em placas de 24 poços, em estufa de CO₂ a 5% e temperatura constante de 37°C, e após estabelecimento e crescimento celular, as células foram transferidas para garrafas de 25 cm³, com a adição de 1 ml de solução de células acrescidas de 4 mL de meio RPMI completo + 10% de soro fetal bovino. A troca do meio ocorreu cada 48h até a utilização das células nos experimentos.

Para determinar o número de células viáveis presentes na amostras obtidas de cultivo foi efetuada uma contagem em câmara de Neubauer, utilizando o corante vital Azul de Tripán 0,4%. Alíquotas da suspensão celular foram diluídas 1:10 na

solução de Azul de Tripán e a porcentagem de células viáveis foi determinada a partir da contagem realizada com o auxílio de microscópio de luz, sendo que as células viáveis excluem o corante enquanto as inviáveis coram-se de azul. Após a contagem, os monócitos foram ressuspensos em meio de cultura na concentração ideal para a realização dos experimentos e plaqueados em placas de cultivo de células de 96 poços para diferenciação em macrófagos. A diferenciação foi realizada adicionando PMA (200nM) ao meio de cultura. Após 48h, os poços foram lavados com PBS a 37°C para eliminar células não diferenciadas e a monocamada de macrófagos obtidas foi utilizada nos experimentos (SIEUWERTS *et al.*, 1995).

4.9.2.1 Avaliação da citotoxicidade celular

A verificação da viabilidade celular foi realizada através do teste do MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazolyl blue),.

As monocamadas de macrófagos (1×10^6 células/ml) foram incubadas em placas de 96 poços durante 24 horas com o extrato vegetal nas concentrações de 1, 10, 100 e 1000 ug/ml, em estufa de CO₂ 5%, a 37°C, posteriormente foram lavadas com PBS e em seguida adicionadas de 180 mL de meio RPMI e 20 mL de MTT (5mg/ml). As células permaneceram incubadas durante 3 horas e ao término deste período o meio de reação foi retirado e o formazan formado foi solubilizado com 100 µL de DMSO (Dimetilsulfóxido). A leitura das absorbâncias foram realizada em leitor de microplaca a 550 nm (SIEUWERTS *et al.*, 1995).

4.9.3 Avaliação da atividade hemolítica em ágar sangue

A atividade hemolítica do extrato bruto e das frações das folhas de *B. duckeana*, foi realizada em placas de ágar sangue (KALEGARI *et al.*, 2011).

As placas de ágar sangue de carneiro foram adquiridas comercialmente através da empresa NEWPROV®. Em disco de papel whatman n° 1 foram impregnados 1000 µg do extrato testado solubilizados em etanol, num volume de 20 µL e levados à secar em estufa 40 °C. O disco de papel contendo a amostra foi colocado sobre a placa de ágar sangue e levado à estufa onde permaneceu por 24 horas a 35 °C. Como controle positivo foi utilizado padrão de triton 10% . Como controle negativo do teste foi utilizado disco de papel impregnado com solução salina 0,9%. Um terceiro controle foi realizado com etanol, o solvente utilizado para solubilizar a amostra, impregnado em papel, também levado à estufa para evaporação do mesmo. Os halos formados foram medidos com régua e comparados. A figura 9 ilustra a preparação das amostras em papel Whatman.

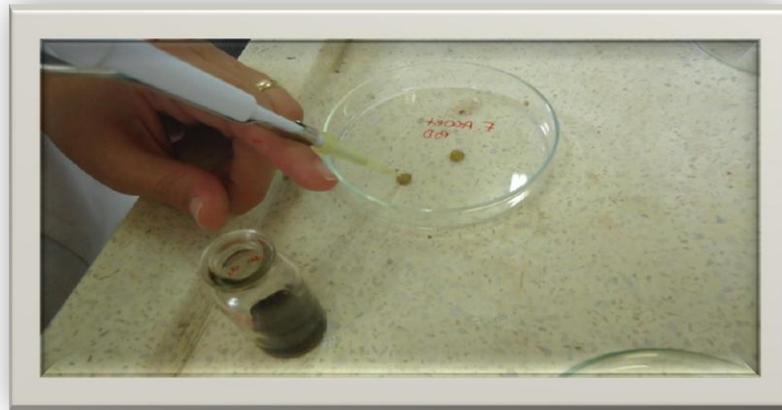


FIGURA 9. PREPARO DOS DISCOS DE PAPEL IMPREGNADOS COM AMOSTRAS PARA ENSAIO DE ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM AGAR SANGUE.

4.9.4 Avaliação da atividade hemolítica em tubos

4.9.4.1 Operações preliminares

Inicialmente, foi transferido 1 mL de sangue de carneiro (Newprov) para balão volumétrico de 50 mL e completado o volume com tampão fosfato pH 7,4. (Suspensão diluída 2%).

A solução foi usada enquanto o sobrenadante permaneceu límpido e incolor e deve ser mantida em geladeira.

4.9.4.2 Teste principal

As amostras foram testadas conforme o quadro 2, partindo da concentração de 1000 µg/mL.

Amostra/Reagente	Volume utilizado (mL)			
Extrato vegetal	0,10	0,20	0,50	1,00
Tampão fosfato pH 7,4	0,90	0,80	0,50	-
Suspensão de sangue (2%)	1,00	1,00	1,00	1,00

QUADRO 2- QUANTIDADES DE REAGENTES PARA ENSAIO DE HEMÓLISE EM TUBOS

Os tubos foram agitados evitando a formação de espuma e deixados por 30 minutos em repouso. Nova agitação foi realizada e as amostras foram deixada em repouso por mais 60 minutos. Após esse tempo o material foi centrifugado por 5 minutos a 3000 rpm. Os tubos foram avaliados quanto a ocorrência de hemólise total, ou seja, onde ocorreu solução límpida, vermelha e sem depósito de eritrócitos (WHO, 1998).

4.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

As amostras testadas foram extrato bruto, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente.

4.10.1 Doseamento de compostos fenólicos totais pelo método Folin Ciocalteu

A determinação do teor de fenólicos totais seguiu o método descrito por Pozharitskaya *et al.*, (2010), com pequenas modificações, onde amostras do extrato bruto e das frações diluídos em metanol foram colocadas em tubo de ensaio e o volume foi completado para 4mL com água destilada. Após total solubilização foi adicionado 0,2mL de reativo de Folin-Ciocalteu novamente homogeneizado e adicionado 0,4mL de carbonato de sódio a 10%, com agitação. Após 30 minutos de repouso em temperatura ambiente, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro à 760nm utilizando curva de calibração de ácido gálico nas concentrações de 2,5, 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 17,5 e 20 µg/mL como padrão para quantificação das amostras. O teste foi realizado em triplicata. Foi construído gráfico de dispersão (concentração/absorbância).

4.10.2 Ensaio da redução do complexo Fosfomolibdênio

Foram preparadas soluções metanólicas das amostras com concentração final de 200µg/mL. A alíquota de 0,3mL foi retirada e foram adicionados à 3 mL de solução reagente do complexo fosfomolibdênio.

Os tubos foram fechados e mantidos em banho-maria à 95°C, por 90 min. Após resfriamento, foi feita a leitura das absorbâncias a 695nm, em espectrofotômetro UV- 1601 Shimadzu®, usando 0,3mL de metanol com 3mL do reagente como branco. A capacidade antioxidante das amostras é expressa em relação à rutina (200µg/mL) usada como padrão, e vitamina C (200µg/mL) cuja atividade antioxidante de referência foi considerada 100%.

O complexo fosfomolibdênico é formado pela reação da solução de Na_3PO_4 (28mL, 0,1mol/L) com solução de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (12mL, 0,03mol/L) e solução de H_2SO_4 (20mL, 3mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final, ajustado com H_2O

destilada para 100 mL, e possui coloração amarela, tornando-se verde à medida que se reduz (PRIETO, PINEDA E AGUILAR; 1999).

As fórmulas abaixo demonstram o cálculo de atividade antioxidante frente a rutina e vitamina C.

$$\text{AA\% EM RELAÇÃO À RUTINA} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (rutina)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

$$\text{AA\% EM RELAÇÃO À VITAMINA C} = \frac{\text{Abs (amostra)} - \text{Abs (branco)}}{\text{Abs (vitamina C)} - \text{Abs (branco)}} \times 100$$

4.10.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH

O potencial de redução do radical DPPH das amostras foi analisado espectrofotometricamente de acordo com Mensor *et al.*(2001). Foram preparadas cinco soluções metanólicas com concentrações diferentes de cada amostra e interpoladas em gráfico para determinação da equação da reta para que fosse possível a determinação da CI 50. Em tubo de ensaio foram adicionados 2,5mL da amostra a ser testada e depois adicionado 1mL de uma solução metanólica de DPPH na concentração de 0,03 mmol/mL. Para cada amostra foi preparado um tubo branco com 2,5mL da solução e 1mL de metanol para cada concentração. Foi realizado controle com 2,5mL de metanol e 1mL de DPPH. Após trinta minutos de reação foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 518nm, correspondente

a absorção máxima do radical em estudo. Como padrões foram utilizados rutina e vitamina C.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada através da fórmula abaixo:

$$AA\% = \frac{100 - (Abs amostra - Abs branco)}{Abs controle negativo}$$

Os valores de concentração necessária para exercer 50% da atividade antioxidante (CI50) foram calculadas no gráfico onde a abscissa representa a concentração da amostra e a ordenada é a média da AA% das amostras testadas, cada amostra possui 5 pontos. A equação da reta do gráfico, do tipo $y = ax + b$, serve de base para determinação do valor de IC50.

4.10.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – ensaio TBARS

Foram utilizados 3 mg de cada amostra e do padrão BHT (di-terc-butil-metil fenol) diluídos em etanol.

Em cada tubo teste foram acrescentados 100 µL da amostra (este volume equivale a 1000 ppm de amostra), 400 µL de água destilada, 500 µL da solução de gema de ovo, 50 µL da solução de Cloreto de 2,2-azo-bis-ácido (ABAP) – 0,035% 1500 µL de ácido acético a 20% e 1500 µL da solução de ácido tiobarbitúrico - TBARS. Os tubos foram levados ao banho Maria 95°C, por 1 hora. Após resfriamento 1500 µL de Butanol foram adicionados e cada tubo foi levemente agitado 10 vezes. Os mesmos permaneceram em repouso por 10 minutos e em seguida foram centrifugados a 5000 rpm por 3 minutos. A leituras das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. O ensaio foi realizado em quintuplicata. Como branco foi utilizado água e como controle negativo foi utilizado etanol (ANDRADE *et al.*, 2010)

4.11 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

As amostras testadas nos ensaios farmacológicos foram o extrato etanólico, fração hexano, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente. Os ensaios foram realizados em parceria entre três universidades, a Pontifícia Universidade Católica do Paraná, através do projeto de iniciação Científica “Atividade antinociceptiva e antiinflamatória de *Byrsonima duckeana*” realizado pela aluna Karina Meira Lorena Fernandes, da Universidade Federal do Amazonas com o projeto de Iniciação Científica “Triagem farmacológica de *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson (Malpighiaceae) em modelos animais de dor inflamatória” desenvolvido pelo aluno Kleyton Cardoso de Andrade e da Universidade Federal do Paraná através do presente projeto.

A avaliação farmacológica foi iniciada com o extrato bruto obtido das folhas de *B. duckeana* W.R. Anderson. Para isso, três ensaios foram realizados: nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina (2,5%), verificação de formação de edema de pata por injeção de formalina e peritonite induzida por carragenina, permitindo dessa maneira uma visão geral da atividade do extrato sobre variados pontos das cascatas bioquímicas de dor e inflamação.

Posteriormente foram realizados na UFAM ensaios com o extrato bruto e frações para comparação das atividades e melhor entendimento dos mecanismos de ação sobre dor e inflamação. Os ensaios realizados na UFAM foram: avaliação de toxicidade no modelo de toxicidade aguda, contorções abdominais induzidas por ácido acético e ensaio da placa quente.

4.11.1 Animais utilizados

Os ensaios farmacológicos foram realizados em duas Universidades parceiras no presente projeto de pesquisa: Pontifícia Universidade Católica do Paraná – (PUC-PR) e Universidade Federal do Amazonas – (UFAM).

Todos os ensaios obtiveram parecer favorável após submissão aos respectivos Comitês de Ética em experimentação animal de cada Instituição (Anexos 4 e 5).

Após a aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa animal da PUC-PR (protocolo nº 675), (ANEXO 4) foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss, machos jovens adultos, com idade de ~2 meses, pesando entre 25 e 35 g fornecidos pelo Biotério da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Após aprovação do projeto pelo comitê de ética em pesquisa da UFAM (ANEXO 5), foram utilizados camundongos (*Mus musculus*), variedade Swiss, de ambos os sexos, jovens, pesando entre 25-30 gramas, fornecidos pelos Biotério da Universidade Federal do Amazonas.

4.11.2. Ensaios farmacológicos “*in vivo*” realizados na PUC-PR

Em todos os experimentos, o extrato etanólico, foi administrado aos animais (n=8) por via oral, através de gavagem, uma hora antes da indução de nocicepção, nas doses de 500 e 1000 mg/kg. Como controle negativo (n=8) foi administrado água, nas mesmas condições descritas.

4.11.2.1 Nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina (2,5%)

Os animais receberam o extrato etanólico e foram transferidos individualmente para um cilindro de vidro (20 cm de diâmetro). Uma hora depois foi injetado 20 µl da solução de formalina a 2,5% no espaço subplantar da pata direita traseira. Em seguida os animais foram observados individualmente por 30 minutos.

O tempo gasto lambendo e/ou mordendo a pata foi contado cumulativamente, por cronômetro sendo observadas duas fases no ensaio 0 – 5 minutos = 1ª fase (dor

neurogênica)/ 15 – 30 minutos= 2ª fase (dor inflamatória). Transcorrido o tempo de observação, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de quetamina-xilasina na concentração de 350 e 40 mg/mL, respectivamente (LAPA *et al.*, 2008).

4.11.2.2 Peritonite induzida por carragenina 1%

Cada grupo recebeu o extrato etanólico uma hora antes da injeção intraperitoneal de 250µL de carragenina 1%. Após 4 horas, com acesso livre a água e ração, os animais foram eutanasiados com injeção intraperitoneal de quetamina-xilasina na concentração de 350 e 40mg/mL, respectivamente. O peritônio foi exposto e foi injetado 2 mL de PBS, massageando-se o abdômen para soltar as células aderidas. As células foram centrifugadas por 10 min a 3000 rpm, o sobrenadante obtido foi utilizado para a determinação de proteínas totais extravasadas para o exsudato peritoneal por leitura em U.V. em 280 nm. O pellet de células foi ressuspensão em 1 ml de PBS, foi adicionado líquido de Turk (1:10) e os leucócitos totais foram contados em câmara de Neubauer (BOSE *et al.*, 2007).

4.11.3 Ensaios farmacológicos “*in vivo*” realizados na UFAM

Após avaliação dos resultados obtidos na triagem realizada com o extrato brutos em parceria com a PUC-PR, novos ensaios farmacológicos foram realizados com o extrato bruto e com as frações obtidas em Soxhlet após fracionamento. Foi avaliada a ação de extrato e frações sobre a toxicidade no modelo toxicidade aguda, teste de contorções abdominais e teste da placa quente, sendo o último apenas para a fração acetato de etila. O teste hipocrático foi realizado juntamente ao teste de toxicidade aguda avaliando-se parâmetros comportamentais.

4.11.3.1 Toxicidade aguda

Para o ensaio de toxicidade aguda oito camundongos *Swiss* (quatro machos e quatro fêmeas) foram utilizados. Os animais receberam o extrato testado por gavagem (via oral), na dose limite de 2000 mg/kg e foram observados, a cada 15 minutos durante as primeiras quatro horas do ensaio, onde o screening hipocrático foi realizado (MALONE; ROBICHAUD, 1962), e diariamente durante 14 dias. O número de animais mortos foi registrado para o cálculo da Dose Letal 50% - (DL50) (LAPA *et al.*, 2008). Durante as primeiras horas de observação, parâmetros comportamentais foram avaliados (screening hipocrático). A figura 10, nos itens A e B mostram a administração das amostras aos animais por gavagem e o campo de observação para avaliação de parâmetros comportamentais respectivamente. O quadro 3 relata os itens observados na avaliação comportamental dos animais.

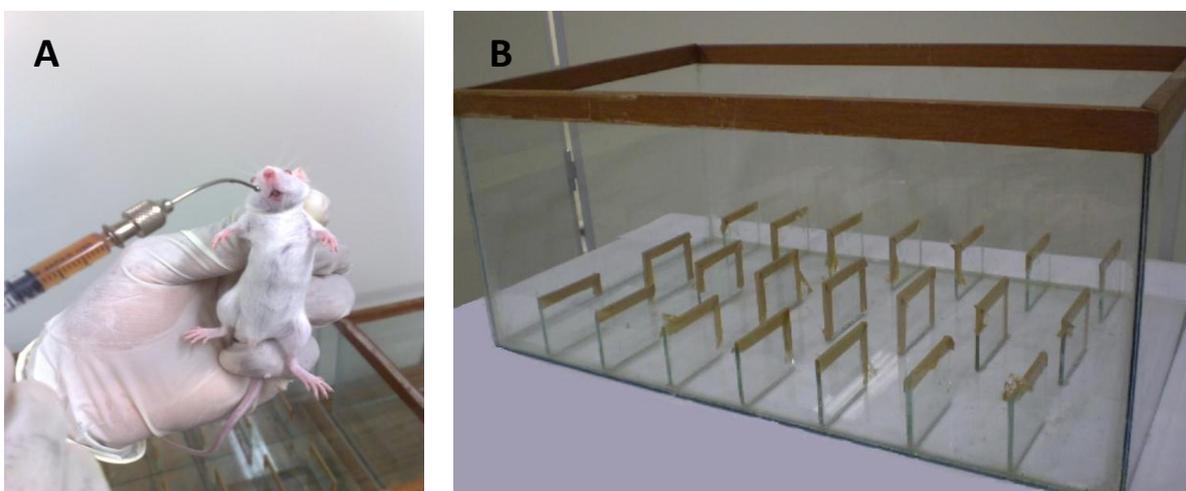


FIGURA 10 – AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA POR GAVAGEM EM CAMUNDONGOS.
NOTA: A- ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS POR GAVAGEM. B- CAMPO DE OBSERVAÇÃO DOS ANIMAIS NO SCREENING HIPOCRÁTICO.
FONTE: ACERVO PESSOAL DE GUILHON-SIMPLICIO, 2012.

Parâmetro	1ª Hora				2ª Hora			
	15	30	45	60	75	90	105	120
Agitação								
Agressividade								
Ataxia								
Contorções								
Convulsões								
Defecação aumentada								
Defecação diminuída								
Defecação líquida								
Ereção da cauda								
Exoftalmia								
Lambida do dorso								
Lambida da pata								
Micção aumentada								
Micção diminuída								
Midríase								
Miose								
Mordedura da cauda								
Movimento estereotipado								
Paralisia								
Piloereção								
Ptose								
Reclusão								
Sedação								
Sialorréia								
Tremor de cauda								
Aumento da frequência cardíaca								
Aumento da frequência respiratória								
Cianose								
Hiperemia								
Palidez								
Dispneia								
Coça o focinho								

QUADRO 3 – PARÂMETROS AVALIADOS PARA REALIZAÇÃO DE TESTE HIPOCRÁTICO

4.11.3.2 Teste das contorções abdominais

Foram utilizados seis grupos de camundongos contendo seis animais, três machos e três fêmeas. Quatro diferentes grupos receberam por via oral (gavagem), 100 mg/kg de cada amostra (extrato etanólico, fração hexano, fração clorofórmio e acetato de etila). O grupo controle positivo recebeu indometacina 10 mg/kg e o grupo controle negativo recebeu solução de ácido acético a 1% em soro fisiológico. As contorções abdominais foram contadas cumulativamente durante os 20 minutos subsequentes à injeção, e o número acumulado total neste período foi tomado como índice da resposta nociceptiva, sendo os grupos testes comparados aos grupos negativo e positivo pelo teste T pareado (LAPA *et al.*, 2008).

4.11.3.3 Teste da placa quente

Os camundongos foram divididos em grupos contendo 3 machos e 3 fêmeas. Doses de 5, 50 e 200 mg/kg da fração acetato de etila foram administradas por via oral em diferentes grupos. Outros grupos receberam 10 mg/kg de indometacina (controle positivo) e soro fisiológico (controle negativo). Os animais foram alocados individualmente em uma placa quente digital (EFF-361, Insight®) previamente aquecida a 52 ± 2 °C no tempo de 0 (para a obtenção dos valores basais) e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das drogas (LAPA, 2008). Os dados de cada grupo foram comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls para avaliar se houve aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de latência para a manifestação do reflexo de dor. A figura 11 ilustra o ensaio da placa quente.



FIGURA 11 - TESTE PLACA QUENTE.

NOTA: A – OBTENÇÃO DOS VALORES BASAIS DO TEMPO DE LATÊNCIA PARA A REAÇÃO AO CONTATO COM UMA PLACA AQUECIDA A 52° C; B – APLICAÇÃO ORAL DAS AMOSTRAS. C – AVALIAÇÃO DA RESPOSTA EM RESPOSTA AVALIADA EM 30, 60, 120 E 180 MIN APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS AMOSTRAS.

FONTE: ACERVO PESSOAL DE GUILHON-SIMPLICIO, 2012.

4.12 FLUXOGRAMA PARA ETAPAS DO TRABALHO

Para elucidar as etapas de pesquisa realizadas no presente trabalho, um fluxograma foi desenhado conforme figura 12.

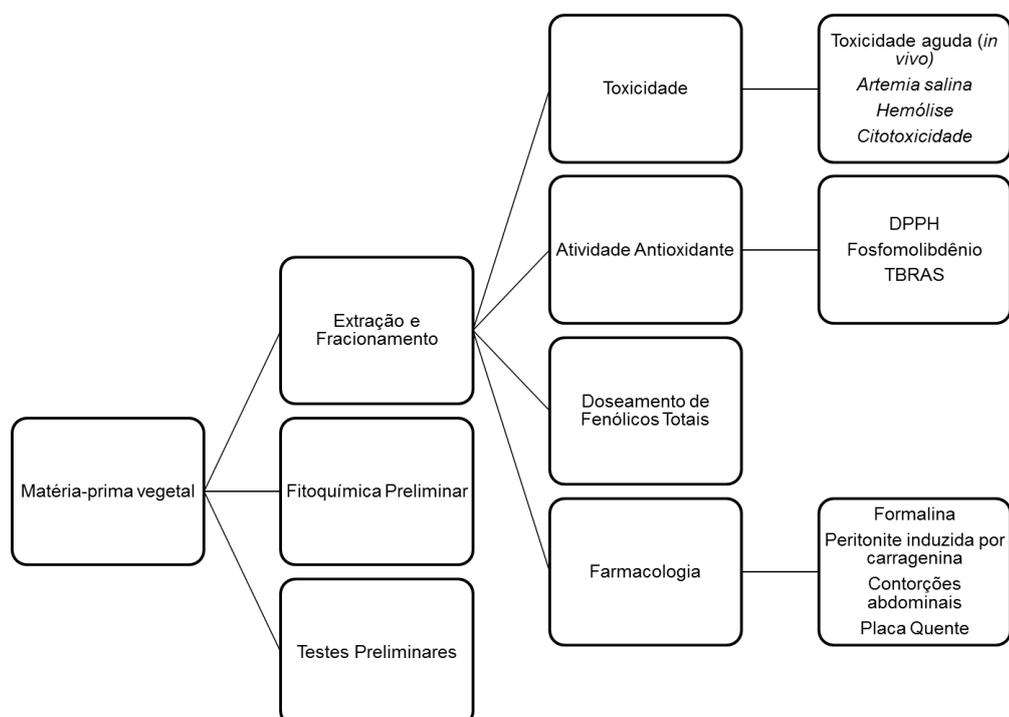


FIGURA 12 - FLUXOGRAMA DOS ENSAIOS REALIZADOS NO PRESENTE TRABALHO

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados como média \pm desvio padrão quando aplicável. Os ensaios antioxidantes e farmacológicos foram comparados pelo teste de Tukey considerando valores de $p < 0.05$. A CI 50 dos ensaios antioxidantes foi calculada por regressão linear.

Os ensaios de cultura de células foram analisados por ANOVA considerando estatisticamente significante valores de $p \leq 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OPERAÇÕES PRELIMINARES

5.1.1 Determinação do rendimento

Após partição em soxhlet modificado com os solventes hexano, clorofórmio e Acetato de etila, os extratos foram secos e os rendimentos obtidos em relação a matéria prima vegetal foram de 0,68%, 0,82% e 0,78% respectivamente.

5.1.2 Determinação do teor de cinzas e umidade

O ensaio do teor de cinzas cinzas foi realizado em duas etapas. Na primeira etapa foi possível verificar a porcentagem de umidade presente na planta. O resultado encontrado foi de 0,44% de umidade.

Na segunda etapa o resultado obtido foi de 1,68% de cinzas para o material vegetal.

A Farmacopeia Brasileira 2010 preconiza o limite de 8-14% para umidade e 15% para cinzas. A umidade excessiva favorece o desenvolvimento de microrganismos e hidrólise de compostos presentes no extrato, sendo prejudicial, principalmente, para os metabólitos secundários presentes na espécie.

As cinzas representam substâncias inorgânicas não voláteis (Mg, Ca, Fe), e quantidades maiores do que o limite podem ser provenientes de materiais de origem externa e pode configurar falsificação ou sujidade do vegetal.

Sendo assim, o material utilizado nos ensaios está de acordo com as exigências descritas.

5.1.3 Teor de sólidos

O ensaio de teor de sólidos permite verificar o rendimento encontrado com a extração empregada. O rendimento foi de 8,60% em média para o extrato bruto.

5.1.4 Extração

O processo de extração realizado em aparelho de Soxhlet modificado foi iniciado com etanol P.A, seguido pelo fracionamento do extrato etanólico obtido por solventes com diferentes polaridades: hexano, clorofórmio e acetato de etila, fornecendo as cinco frações: Extrato bruto etanólico (EBExTOH), hexano (HEX),

clorofórmica (CLOR), Acetato de etila (ACOet), e fração remanescente (FREM), seguindo dessa maneira um fluxo de polaridade partindo do menos polar e aumentando a polaridade de acordo com os solventes. O fluxograma, na figura 13, ilustra as etapas empregadas e os rendimentos obtidos em cada etapa.

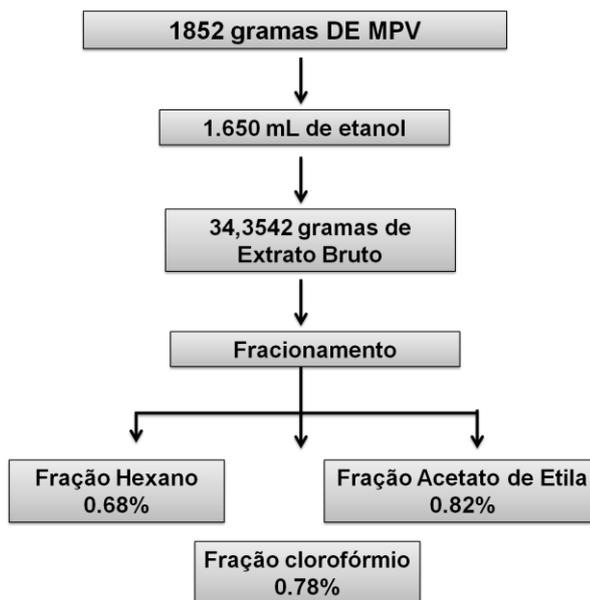


FIGURA 13 - FLUXOGRAMA DA EXTRAÇÃO E DO FRACIONAMENTO COM RENDIMENTOS.
 FONTE: O AUTOR, 2014.

5.2 Prospecção fitoquímica preliminar

O estudo de metabólitos secundários proporciona a descoberta de novos fármacos, permite a descoberta de novos alimentos e o avanço da química de produtos naturais. (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010).

A análise fitoquímica é uma maneira prática de conhecer os principais constituintes químicos de uma espécie. A prospecção fitoquímica é uma técnica possível de ser realizada com poucos recursos e que possibilita o delineamento do estudo biomonitorado, possibilitando o desenho do projeto de acordo com a presença de determinados grupos de metabólitos secundários presentes na amostra vegetal.

Tendo como objetivo conhecer os constituintes químicos da espécie ou avaliar a presença dos mesmos, quando não são encontrados achados na literatura acerca da espécie estudada, a prospecção fitoquímica é de grande valia.

Assim, visando conhecer os grupos de metabólitos presentes em *Byrsonima duckeana* procedeu-se ao ensaio.

O quadro 4 reúne os resultados obtidos nas reações sistemáticas da análise fitoquímica.

Metabólito	Resultado	Observação
Leucoantocianidinas	-	
Heterosídeo Flavônico	+	
Flavonóis	+	Para reação de Taubock
Esteróides e Terpenos	+	Liberman-Bouchard
	+	Azul na reação de Keller Keliani
Alcaloides	-	Negativo nos 4 tubos
Saponinas	-	
Taninos	+	Cloreto Férrico
	+	Sulfato Amoniacal
Cumarinas	-	

QUADRO 4. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS ENCONTRADOS NA PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR REALIZADA COM AS FOLHAS DE *BYRSONIMA DUCKEANA* W.R. ANDERSON.

Houve uma época onde os compostos derivados do metabolismo secundários eram considerados produtos sem atividade biológicas definida ou eram vistos apenas como produtos da excreção. Hoje, sabe-se da importância que os mesmos possuem, seja para o vegetal, seja para o ser humano (SANTOS, 2007).

As espécies do gênero *Byrsonima*, são ricas em substâncias antioxidantes em especial taninos e flavonoides. No Nordeste brasileiro, ocorrem muitas espécies do gênero *Byrsonima*, de onde são relatadas a presença de terpenos, como em *B. verbascifolia* e *B. variabilis*. Há relatos também de uma mistura de ácido gálico e

galato de metila, quercetina-3-O- α -L-piranosídeo-3-O- β -D-galactopiranosídeo em *B. crassa*. Outras espécies de *Byrsonima* relatam a presença de esteróides, triterpenos, flavonoides e proantocianidinas (ROLIM *et al.*, 2013).

Assim, a presença de esteróides, terpenos, taninos, heterosídeos flavônicos e flavonóis, como detectado neste estudo, está de acordo com achados em *Byrsonimas* (MIDDLETON; KANDASWANMI; THEOHARIDES, 2000) e sugere variadas atividades biológicas a serem pesquisadas na espécie tais como atividade antioxidante, atividades anti-inflamatória e analgésicas.

A ausência de alcaloides nas folhas da espécie está de acordo com resultados descritos na literatura para o gênero, além disso, a presença de flavonoides também já é bem descrita em trabalhos de isolamento e identificação com outras espécies pertencentes ao gênero *Byrsonima*.

Taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico, são responsáveis pela adstringência de vários frutos. Pesquisas acerca das atividades biológicas evidenciaram atividades contra microrganismos, ações antiinflamatórias e cicatrizantes, além de atividades anticarcinogênicas. Alguns trabalhos relatam atividade inibidora da transcriptase reversa. Devido a grande habilidade em formar ligações com proteínas são relatados efeitos de toxicidade aos taninos. Vale lembrar da atividade antioxidante dos taninos, capazes de reagir com radicais livres por interceptar o oxigênio livre (MONTEIRO; AMORIN, 2005).

Além disso, flavonóides são conhecidos por seu papel antioxidante. São utilizados na medicina oriental nas plantas e condimentos há anos, embora na medicina ocidental ainda não sejam utilizados tão frequentemente. Doenças neurodegenerativas, renais e o câncer já são alvos de estudos com flavonóides (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Pesquisas sugerem que os flavonóides apresentam atividades antitumorais, antivirais, anti-hemorrágicos, hormonais e anti-inflamatórios, antimicrobianos (ZUANAZZI. MONTANHA, 2007).

Muitos têm sido os estudos de terpenos em suas combinações estruturais variadas. Propriedades anti-inflamatórias, antitumorais, antioxidantes, atuação sobre a vascularização (ginkogolídeos), atuação sobre fatores plaquetários, além da utilização na indústria alimentícia, como flavorizantes, adoçantes, e na indústria de cosméticos, são atribuídas ao vasto mundo dos terpenos (NIERO; MALHEIROS

2009). A presença de esteróides e terpenos e flavonóides, fez com que esse estudo fosse delineado buscando atividades sobre dor e inflamação. Vale ressaltar a intenção de verificar a atividade antioxidante já estudada para os metabólitos referidos, em especial, os flavonóides.

Assim, os achados na prospecção fitoquímica preliminar, delinearam o estudo para a busca de atividades sobre a oxidação e sobre a dor e inflamação.

5.3 ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIA

5.3.1 Cromatografia em coluna

Foi realizado fracionamento com a fração hexano utilizando cromatografia em coluna de sílica gel.

A partir da submissão da fração hexano a cromatografia em coluna, foram obtidas 146 frações. As frações de número 5 a 8 apresentavam coloração amarelada e tinham aspecto gorduroso.

As frações 9-16 se apresentaram como cristais também de coloração amarelada. Os cristais foram lavados em éter de petróleo e reunidos. Sendo submetidos a cromatografia em camada delgada - CCD posteriormente.

As frações de número 5 a 16 foram submetidas a CCD, utilizando como fase móvel sistema Tolueno:Acetato de etila 93:7 e como revelador vanilina sulfúrica 1:1. Todas as frações apresentaram mesma banda característica de compostos terpenóides após serem reveladas, com mesmo Rf.

Após análise as frações 5-8 e 9-12 e 13-16 foram reunidas submetidas a análise estrutural de Ressonância Magnética nuclear.

O extrato etanólico, assim como as frações clorofórmio e acetato de etila foram submetidos a Cromatografia Líquida de alta eficiência para delineamento de perfil cromatográfico.

O fluxograma a seguir, descrito na figura 14, reúne as etapas que foram executadas no presente trabalho, relacionadas a obtenção de frações enriquecidas em metabólitos secundários e moléculas.

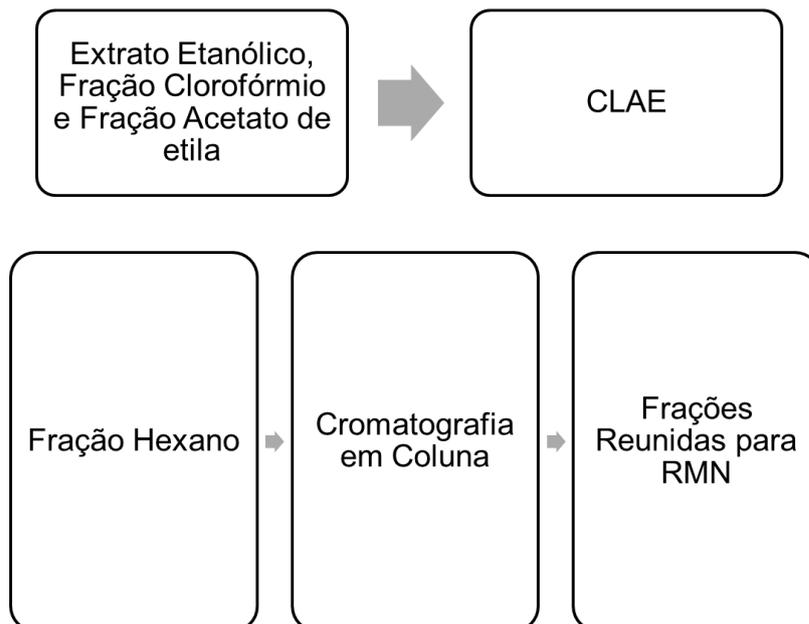


FIGURA 14. FLUXOGRAMA COM ETAPAS DA IDENTIFICAÇÃO DE SUBSTÂNCIAS
FONTE: O AUTOR, 2014.

5.3.2. Elucidação estrutural

5.3.2.1 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência – CLAE

O extrato bruto, a fração clorofórmio e a fração acetato de etila, foram submetidas a CLAE para o delineamento de perfil cromatográfico. O cromatograma obtido com a análise do extrato bruto está mostrado na figura 15.

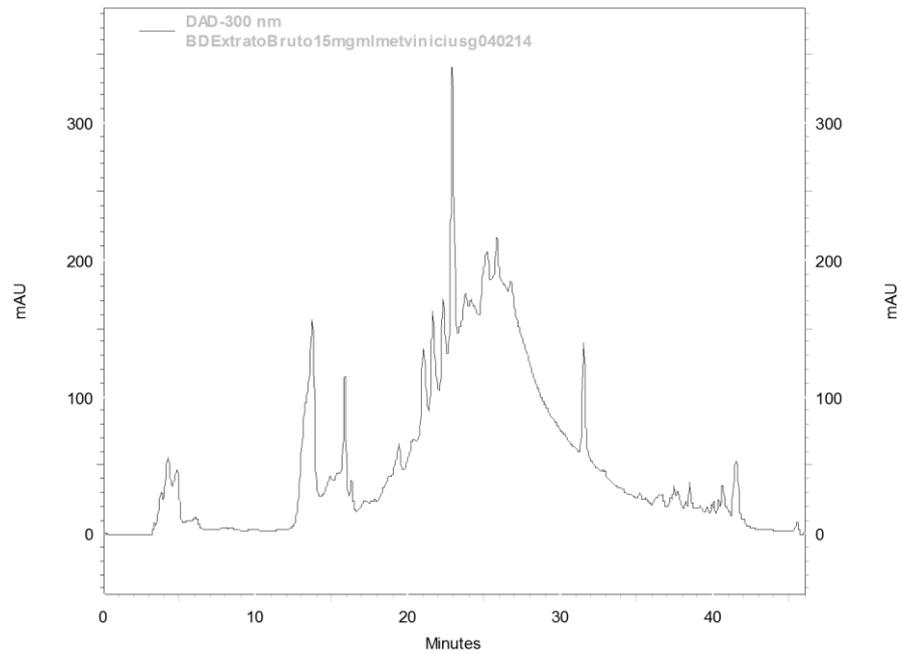


FIGURA 15: PERFIL CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO BRUTO DE *B. DUCKEANA*.

Da mesma forma, a fração clorofórmica, também foi submetida a CLAE utilizando as mesmas condições descritas no item 4.7 para o extrato bruto com mesmo sistema de solventes. A figura 15 demonstra o perfil cromatográfico encontrado para a fração clorofórmio.

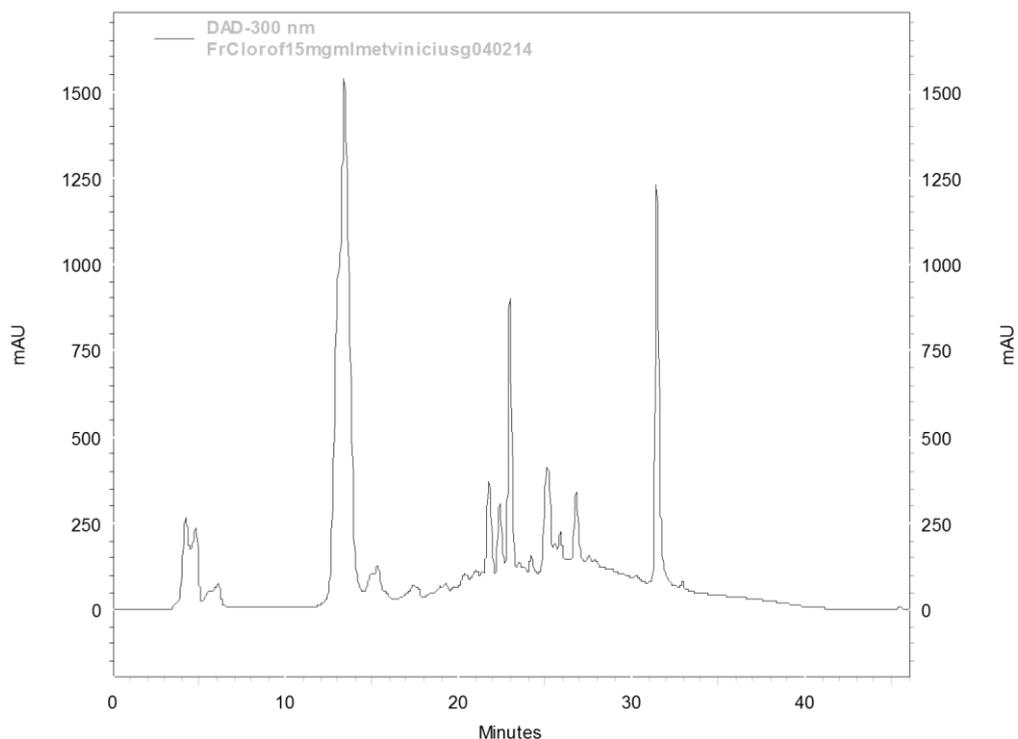


FIGURA 16 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO.

Observa-se um pico presente com tempo de retenção de 4,87 minutos nas duas amostras testadas. De acordo com Bednarczuck (2012), para este sistema de solvente, com esses parâmetros de corrida, este pico trata-se do ácido gálico.

Tentando confirmar a presença do metabólito em questão nas amostras testadas, procedeu-se a corrida apenas com padrão de ácido gálico e em seguida uma nova corrida com a fração clorofórmio adicionada de ácido gálico. Os resultados estão expressos nas figuras 17 e 18 respectivamente.

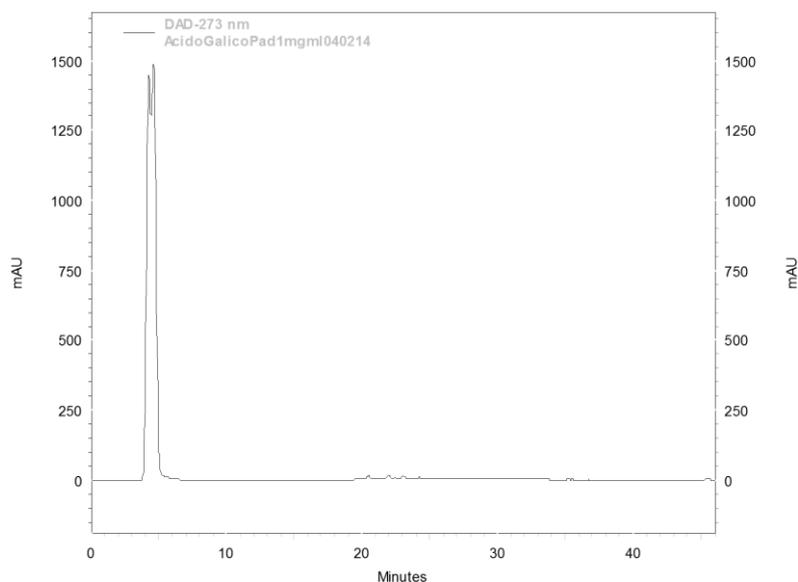
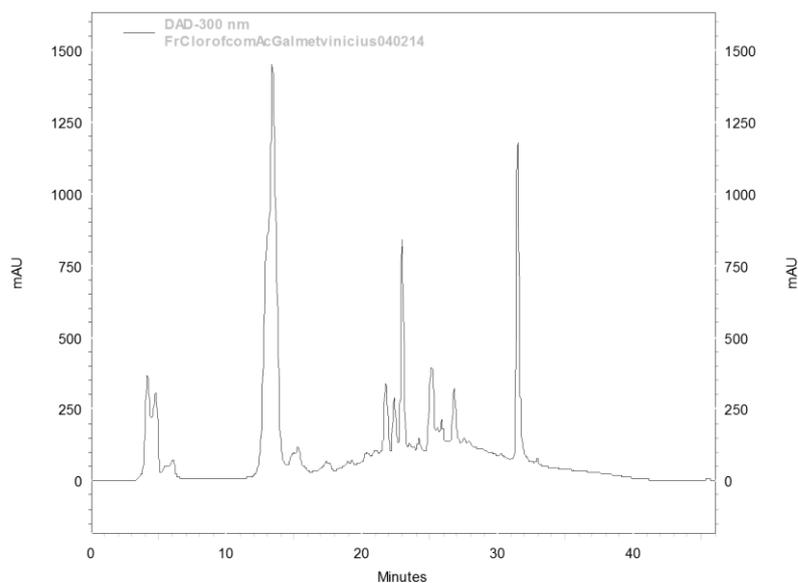


FIGURA 17 – PERFIL CROMATOGRÁFICO DO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO.

FIGURA 18: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DE *B. DUCKENANA* ADICIONADA DE ÁCIDO GÁLICO.

O pico com tempo de retenção de 4,87 minutos aparece no cromatograma na figura 17, onde apenas o padrão de ácido gálico foi utilizado como amostra. Já na figura 18, onde a fração clorofórmio foi co-injetada com ácido gálico, o pico em 4,87 minutos foi amplificado, sugerindo que o ácido gálico presente na amostra somou-se a amostra de padrão de ácido gálico adicionada a fração clorofórmio, gerando a amplificação do sinal com este tempo de retenção.

Para confirmar este achado nos cromatogramas, com a presença de ácido gálico, foi realizada comparação entre os espectros de uv do padrão de ácido gálico e dos picos com tempo de retenção de 4,87 minutos. Ambos apresentam as mesmas bandas características, sugerindo que se trata do mesmo composto, conforme figuras 19 e 20.

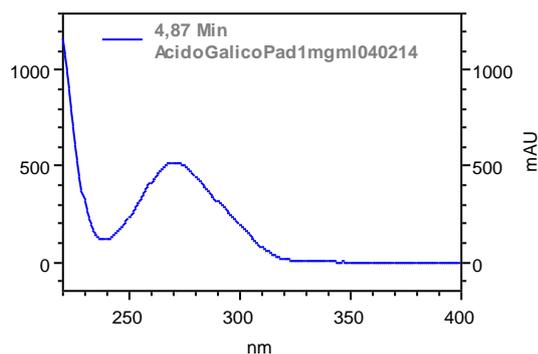


FIGURA 19 - ESPECTRO DE U.V DO PADRÃO DE ÁCIDO GÁLICO.

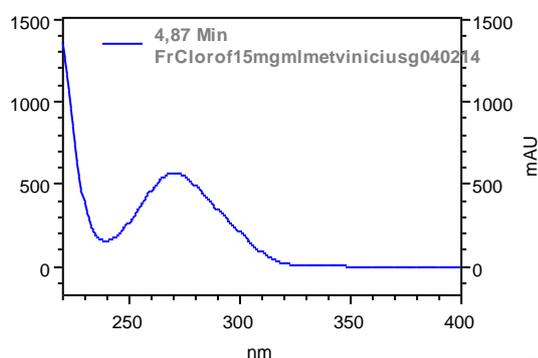


FIGURA 20: ESPECTRO DE UV DO PICO COM TEMPO DE RETENÇÃO DE 4,87 MINUTOS NA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO.

A fração acetato de etila também foi submetida a análise por CLAE (figura 21). A mesma substância está presente com mesmo tempo de retenção de 4,87 minutos. O que sugere a presença de ácido gálico nas três amostras testadas.

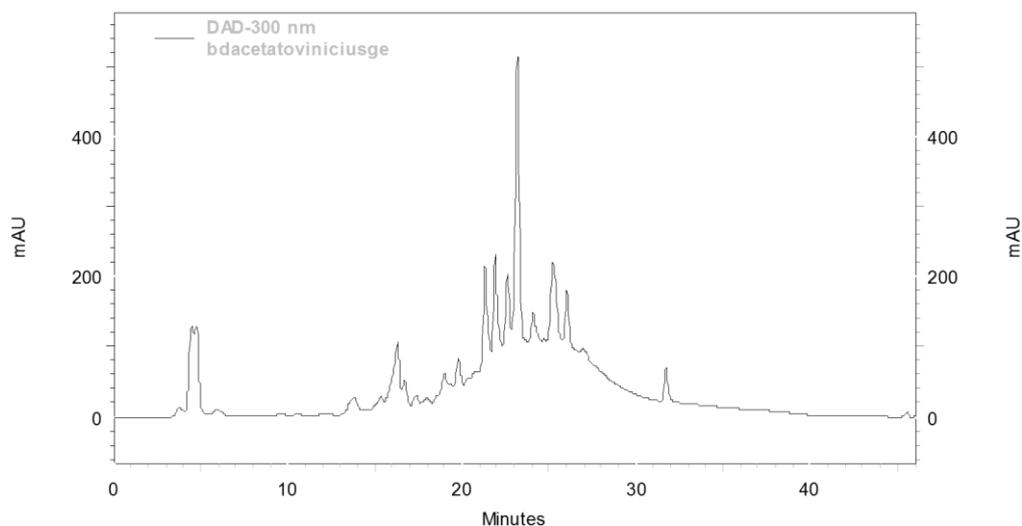


FIGURA 21: PERFIL CROMATOGRÁFICO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA EM 300 NM.

Observando os cromatogramas referentes ao extrato etanólico, a fração clorofórmica e fração acetato de etila (figura 21), é verificada a presença de composto de tempo de retenção 4,87. Tal composto, presente nas duas amostras, apresenta espectros de ultra violeta com bandas de intensidade iguais ao do padrão de ácido gálico.

A presença do ácido gálico em *B. duckenana*, está de acordo com outros trabalhos realizados com plantas do gênero *Byrsonima*. A figura 22 ilustra a estrutura química do ácido gálico encontrado nas amostras testadas.

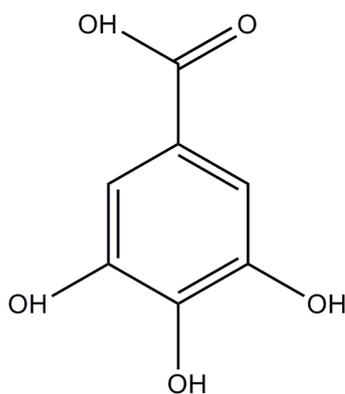


FIGURA 22: ESTRUTURA QUÍMICA DO ÁCIDO GÁLICO.

As atividades biológicas relatadas ao ácido gálico são variadas. Sabe-se que o ácido gálico é utilizado na indústria alimentícia por sua capacidade inibitória da peroxidação lipídica, impedindo as rancificações. Apresenta efeito antimutagênico, citotóxico para hepatócitos e apresenta efeito sobre células da linhagem HL-60 (Yen; DUH; TSAI, 2002).

A presença do ácido gálico em *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson indicou a este trabalho a busca pela atividade antioxidante, dada a atividade antioxidante do mesmo presente na literatura e a presença de compostos fenólicos variados achados na prospecção fitoquímica preliminar, indicando potencial antioxidante da espécie.

5.3.2.2 Ressonância Magnética Nuclear - RMN

5.3.2.2.1 RMN H – Substância 1

As amostras oriundas da cromatografia em coluna realizada com a fração hexano de número 5-8, 9-12 e 13-16 foram reunidas após análise por CCD e denominada como substância 1. Foi realizada análise de Ressonância Magnética Nuclear.

As figuras 23 e 24 mostram os espectros de RMN ^1H da substância 1 em que foram identificados sete singletos entre δ 0,75 e δ 1,2 (δ 0,75; δ 0,89; δ 0,95; δ 1,00; δ 1,05; δ 1,18; δ 1,25) indicando a presença de grupos metílicos na molécula nos carbonos C-24, C-25 e C-29, C-30, C-26, C27, e C-28 respectivamente, sugerindo tratar-se de um triterpeno. Um sinal em δ 0,87 mostrou a presença de um dubleto atribuído aos hidrogênios do Me-23. Um multiplete entre δ 2,20 e δ 2,45 indica a presença de três hidrogênios α -carbonílicos referentes aos hidrogênios α -carbonílicos, e sinais entre δ 1,25 e δ 1,73 indicando presença de hidrogênios metilênicos e metínicos da molécula.

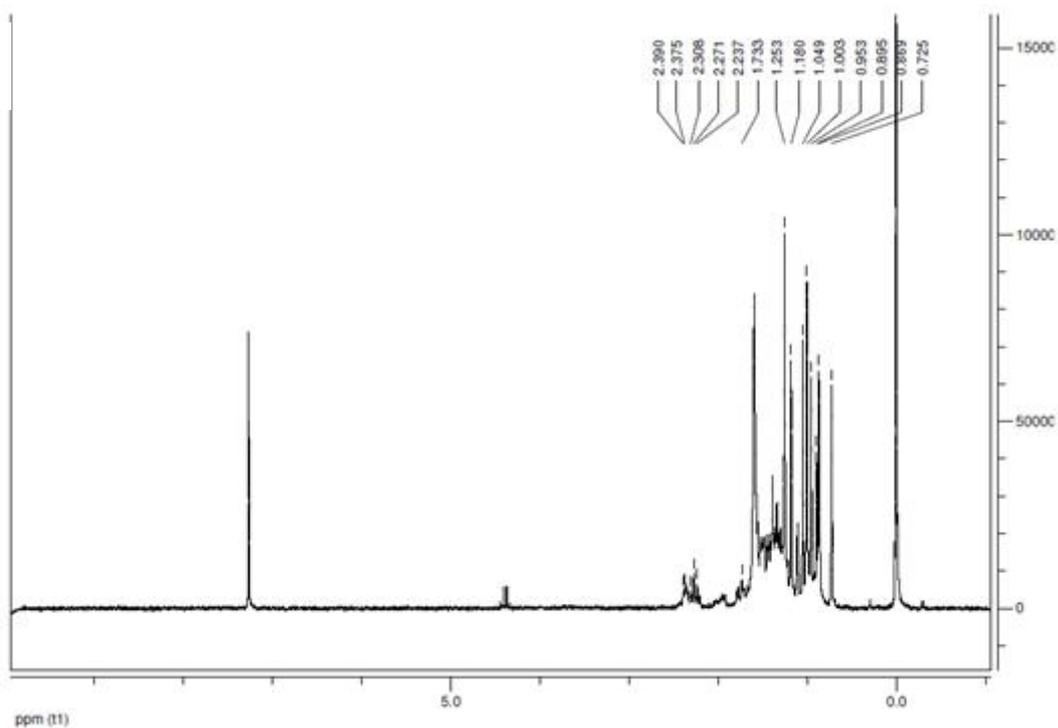


Figura 23- ESPECTRO DE RMN ^1H (CDCl_3 , 200 HZ) DA SUBSTÂNCIA 1.

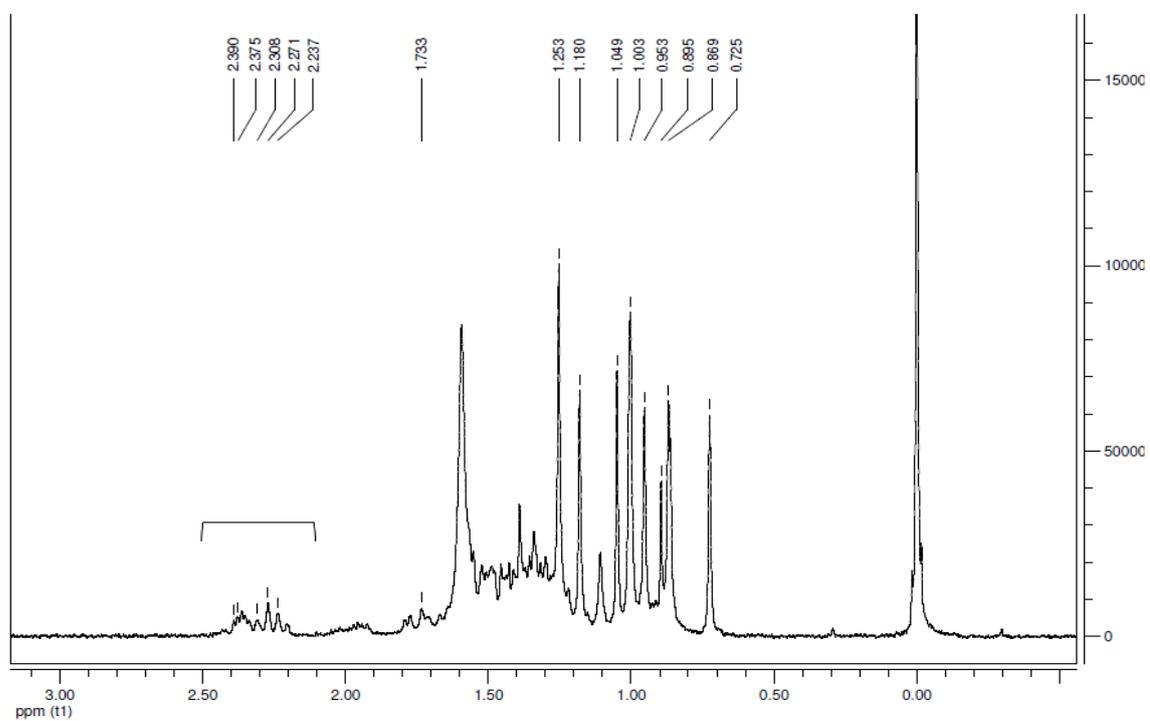


FIGURA 24 – DETALHAMENTO DOS DESLOCAMENTOS QUÍMICOS ENTRE δ 0,75 δ E δ 2,50 DO ESPECTRO DE RMN ^1H DA SUBSTÂNCIA 1

5.3.2.2.2 RMN ^{13}C

As figuras de 25 e 26 mostram os espectros de carbono (RMN ^{13}C e DEPT 135°) da substância 1. A análise dos espectros permitiram identificar 30 carbonos com sinais abaixo de 60 δ que caracterizam a presença de carbonos sp^3 . Pelo espectro de carbono DEPT135° foi possível identificar que estes carbonos se dividem em quatro terciários (CH), onze secundários (CH $_2$), oito primários (CH $_3$) e sete quaternários.

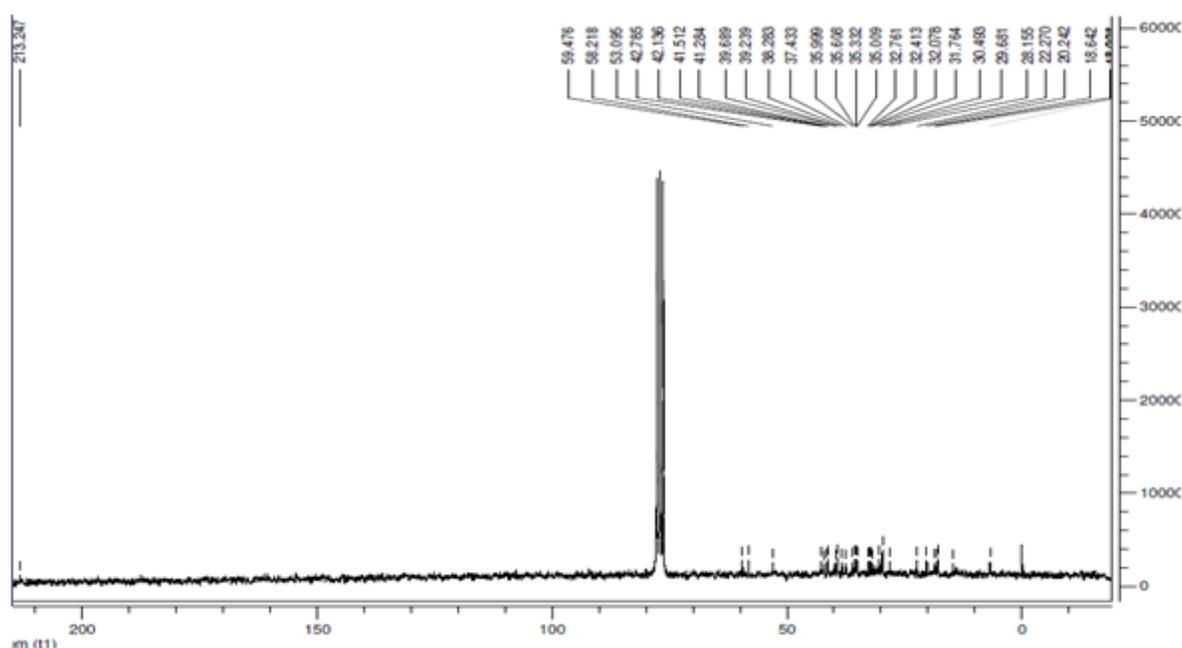


Figura 25 – ESPECTRO DE RMN – ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 1

O sinal em δ 213,25 é atribuído ao grupo carbonílico (C-3) da porção cetona. E o sinal em δ 6,8 indica presença de um grupo metílico (C-23) bastante protegido atribuído ao efeito γ -gauche promovido pela carbonila.

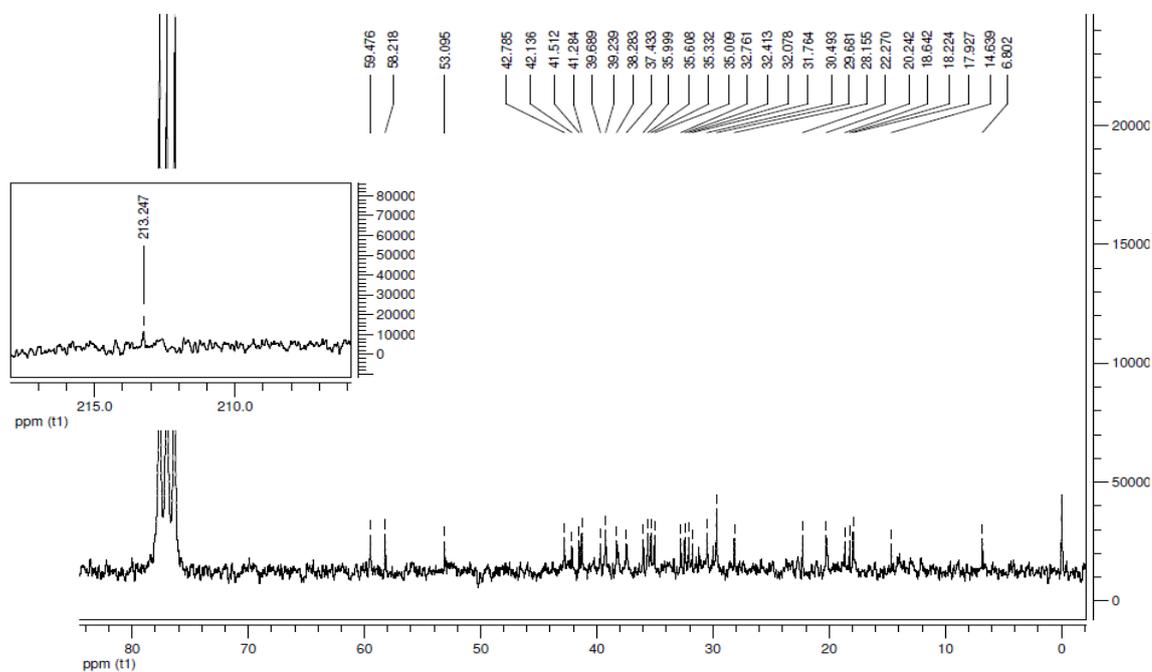


FIGURA 26 – DETALHAMENTO DO ESPECTRO DE RMN ^{13}C DA SUBSTÂNCIA 1 COM EXPANSÃO DA REGIÃO ENTRE 210 δ E 215 δ

Os dados espectrais da substância 1 em comparação àqueles identificados na literatura (ALMEIDA, *et al.*, 2011 e ARAGÃO, *et al.*, 1990) expostos na Tabela 4 permitem sugerir que a estrutura química da substância em estudo é a do triterpeno pentacíclico Friedelina.

TABELA 4 – DADOS DE RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) DA SUBTÂNCIA 1 EM COMPARAÇÃO AOS DADOS DA LITERATURA (ALMEIDA *et al.*, 2011 E ARAGÃO *et al.*, 1990)

Carbono	ALMEIDA, <i>et</i>	ARAGÃO, <i>et al.</i> ,	Substância 1
1	22,3 (CH ₂)	22,7 (CH ₂)	22,3 (CH ₂)
2	41,5 (CH ₂)	41,8 (CH ₂)	41,5 (CH ₂)
3	213,2 (C)	213,0 (C)	213,3 (C)
4	58,2 (CH)	58,2 (CH)	58,2 (CH)
5	42,1 (CH)	42,8 (CH)	42,8 (CH)
6	41,3 (CH ₂)	41,2 (CH ₂)	41,3 (CH ₂)
7	18,2 (CH ₂)	18,3 (CH ₂)	18,2 (CH ₂)
8	53,3 (CH)	53,2 (CH)	53,1 (CH)
9	37,5 (C)	37,8 (C)	37,4 (C)
10	59,5 (CH)	59,5 (CH)	59,5 (CH)
11	35,6 (CH ₂)	35,2 (CH ₂)	35,3 (CH ₂)
12	30,5 (CH ₂)	32,4 (CH ₂)	32,4 (CH ₂)
13	39,7 (C)	38,2 (C)	38,2 (C)
14	38,3 (C)	39,7 (C)	39,6 (C)
15	32,8 (CH ₂)	30,6 (CH ₂)	32,4 (CH ₂)
16	36,0 (CH ₂)	36,1 (CH ₂)	36,0 (CH ₂)
17	30,0 (C)	30,0 (C)	30,5 (C)
18	42,8 (CH)	42,9 (CH)	42,1 (CH)
19	35,4 (CH ₂)	35,3 (CH ₂)	35,6 (CH ₂)
20	28,2 (C)	28,2 (C)	28,2 (C)
21	32,4 (CH ₂)	32,9 (CH ₂)	32,7 (CH ₂)
22	39,3 (CH ₂)	39,3 (CH ₂)	39,2 (CH ₂)
23	6,8 (CH ₃)	6,8 (CH ₃)	6,8 (CH ₃)
24	14,7 (CH ₃)	14,1 (CH ₃)	14,6 (CH ₃)
25	17,9 (CH ₃)	18,2 (CH ₃)	17,9 (CH ₃)
26	20,3 (CH ₃)	18,6 (CH ₃)	18,6 (CH ₃)
27	18,7 (CH ₃)	20,1 (CH ₃)	20,2 (CH ₃)
28	32,1 (CH ₃)	32,1 (CH ₃)	32,1 (CH ₃)
29	31,8 (CH ₃)	31,8 (CH ₃)	31,8 (CH ₃)
30	35,0 (CH ₃)	35,0 (CH ₃)	35,0 (CH ₃)

No gênero *Byrsonima*, alguns terpenos já foram isolados. Na literatura há trabalhos com o isolamento de variadas classes de terpenos. *Byrsonima crassa* (HIGUCHI *et al.*, 2008) e *Byrsonima microphylla* (AGUIAR *et al.*, 2005), são exemplos de espécies do gênero com trabalhos demonstrando a presença desses metabólitos.

Além disso, a presença de Friedelina também foi reportada em algumas espécies, como por exemplo, *Byrsonima gardneriana* A. Juss (ROLIN *et al.*, 2013), *Byrsonima verbascifolia* (MARINHO, 2008);

Nesse contexto vale ressaltar a importância desta classe de metabólitos secundários, os terpenos, classe de metabólito secundário na qual a Friedelina se encaixa.

A friedelina é um triterpeno pentacíclico da série friedelano e foi identificada neste estudo como estando presente nas folhas de *B. duckeana*. Possui atividade antiinflamatória, antimicrobiana, antifúngica e alelopática (TREVISAN, 2010).

Desta forma, sua presença nas folhas de *B. duckeana* reforça nosso interesse na busca por substâncias com atividades biológicas em especial sobre dor e inflamação. A figura ilustra a estrutura química do triterpeno friedelina.

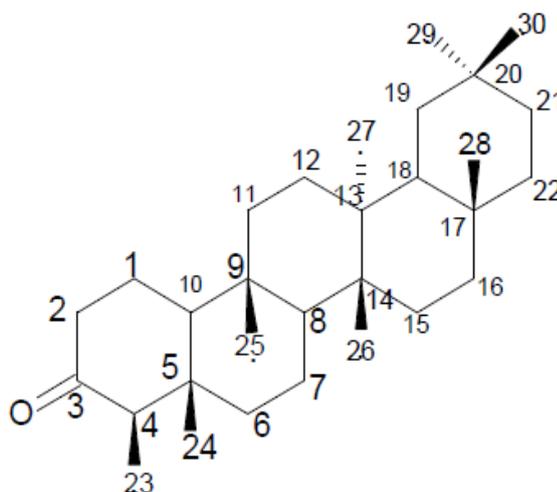


FIGURA 27: ESTRUTURA QUÍMICA DO TERPENO FRIEDELINA ISOLADO DA FRAÇÃO HEXANO.

5.4 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

5.4.1 *Artemia salina*

O ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina* é um método alternativo utilizado para determinação de toxicidade, uma vez que os náuplios de *Artemia* são muito sensíveis, sendo um método importante e utilizado em estudos de ecotoxicidade, indicando o potencial tóxico da amostra testada para o meio ambiente (LIMA *et al.*, 2011).

Desta forma, trata-se de um ensaio rápido e de fácil execução que serve como parâmetro de avaliação da toxicidade e tem sido utilizado como uma grande ferramenta de triagem de substâncias tóxicas.

As amostras testadas no ensaio de *Artemia salina* não apresentaram bioatividade, uma vez que os resultados não apresentaram significância estatística ao ser comparado aos controles do teste. A fração acetato de etila e a fração remanescente não foram testadas. Assim, admite-se que no modelo testado as amostras não apresentam toxicidade.

5.4.2 Cultura de células

Estima-se que no mundo todo, até o ano de 2020, mais de dez milhões de pessoas tenham neoplasias (BRAGA *et al.*, 2011), e sabe-se que o câncer é uma das doenças mais temidas por estar associada a dor e a morte (ALMEIDA *et al.*, 2005).

Comprovadamente, os tratamentos para as neoplasias são as quimoterapias, as cirurgias, a radioterapia e tratamentos hormonais. No entanto, práticas alternativas, incluindo o uso de plantas, são percebidas pelas populações (CRUZ *et al.*, 2009).

É grande o número de pessoas que recorrem às plantas para tratamentos de neoplasias, seja como ponto chave do tratamento, ou seja como coadjuvante,

baseando-se no conhecimento empírico acerca do reino vegetal, embora não se possa justificar protocolos baseando-se em conhecimento empírico, o mesmo não pode ser desprezado, dada a riqueza de informações acerca do uso de espécies vegetais, acumuladas ao longo do tempo (ROGERO *et al.*, 2003).

Dada a importância do quadro de neoplasia, e a boa aceitação das plantas medicinais pelas pessoas, se faz importante a busca de substâncias que possam atuar sobre o câncer.

Com o controle cada dia mais rigoroso acerca da utilização de animais em experimentos, há a necessidade de que sejam padronizadas novas técnicas para avaliar a toxicidade de substâncias (ROGERO *et al.*, 2003).

Assim, os ensaios que utilizam cultura de células e avaliação de viabilidade celular tem se tornado uma ferramenta importante na avaliação da toxicidade.

Ensaio que utilizam culturas de células basicamente consistem em colocar o material avaliado em contato seja direta ou indiretamente com uma determinada cultura de células de mamíferos e verificar as alterações e/ou a viabilidade celular, seja por incorporações de corantes vitais, ou por diminuição da formação de colônias celulares. A cultura de células permite limitar as variáveis envolvidas nos ensaios, tem menor tempo de execução, são reprodutíveis e sensíveis (ROGERO *et al.*, 2003). Além disso, os testes de citotoxicidade são os primeiros ensaios para a aplicação clínica de um novo material (CASTRO *et al.*, 2004).

O teste do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina) é um teste usado para avaliar viabilidade celular. O MTT, quando incubado com células vivas, tem seu substrato metabolizado por enzimas mitocondriais transformando-se de um composto amarelo em um composto azul escuro (formazan), solúvel em solvente orgânico. O formazan formado é quantificado e reflete a viabilidade celular. Desde a descrição do teste, o mesmo tem sido amplamente aplicado nos ensaios de cultura de células (PEREZ *et al.*, 2008). Essa reação é expressa em percentual de células vivas permitindo que se considere a viabilidade celular (CASTRO *et.*, 2004).

Nesse sentido esse ensaio, foi utilizado nesse trabalho, avaliando a citotoxicidade de extrato bruto e frações de *Byrsonima duckeana* em células da linhagem HT29, linhagem humana de tumor de cólon e células U937 que são células de linhagem monocítica humana.

As figuras 28 e 29 se referem aos resultados do ensaio do MTT para o extrato etanólico, fração clorofórmio, fração acetato de etila e fração remanescente para a linhagem celular HT29.

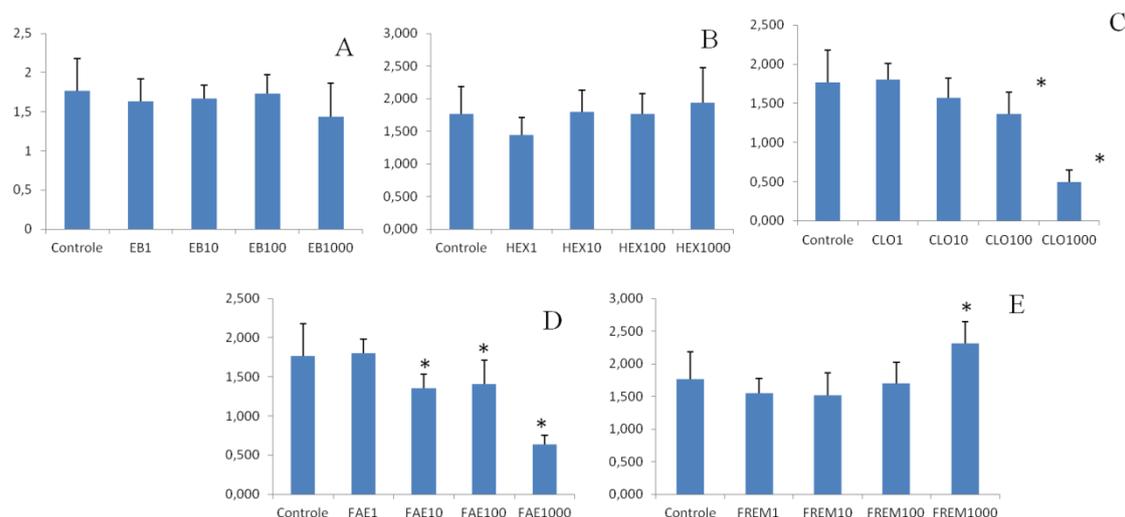


FIGURA 28- CITOTOXICIDADE EM ENSAIO MTT EM CÉLULAS HT29.

NOTA: A – EXTRATO BRUTO ETANÓLICO B- FRAÇÃO HEXANO – C- FRAÇÃO CLOROFÓRMIO – D- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA – E- FRAÇÃO REMANESCENTE.

As células HT29 tratadas com o extrato etanólico e com a fração hexano não apresentaram diferença estatística com as células sem tratamento, indicando não haver toxicidade nessas amostras. Já no ensaio realizado com as frações acetato de etila e clorofórmio foram verificadas atividade citotóxica nas concentrações de 10, 100 e 1000 µg/mL, indicando que esses extratos possuem substâncias com potencial na inibição do desenvolvimento de células tumorais. Essas frações são mais ricas em substâncias com caráter mais polar e em compostos fenólicos, em especial flavonóides como foi evidenciado na prospecção fitoquímica.

A fração remanescente, no entanto, na concentração de 1000 µg/mL estimulou a proliferação celular, o que permite pensar no caráter das substâncias presentes.

Já nos ensaios realizados com células U937 nenhuma amostra apresentou diferença estatística na viabilidade celular, demonstrando assim que as amostras testadas não atuam diminuindo a viabilidade celular deste tipo de linhagem celular.

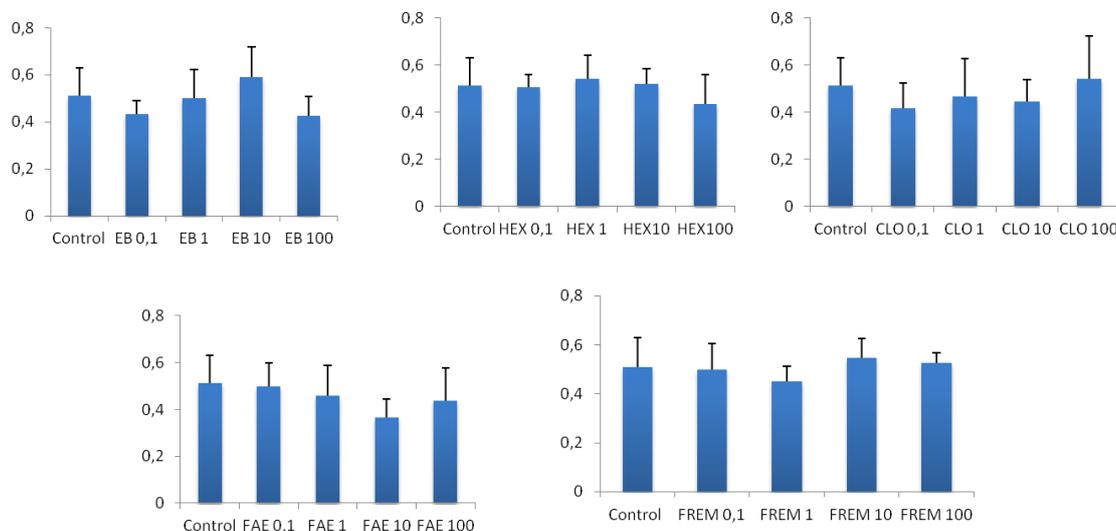


FIGURA 29- CITOTOXICIDADE DO EXTRATO BRUTO E FRAÇÕES DE *BYRSONIMA DUCKEANA* W.R. ANDERSON NO ENSAIO MTT CÉLULAS DA LINHAGEM U937.

A importância encontrada nestes resultados se dá pelo fato, das amostras testadas apresentarem atividade apenas sobre as células da linhagem HT29, uma linhagem específica para câncer de cólon de intestino. As frações com atividade inibitória da proliferação celular foram aquelas com características mais polares, ricas em substâncias fenólicas e também ricas com a presença de ácido gálico.

O fato das amostras apresentarem atividade inibitória da proliferação celular sobre as células da linhagem HT29 sem apresentar atividade sobre as células da linhagem U937, que são consideradas células normais, é extremamente interessante. As células da linhagem U937 são células da linhagem linfocítica humana. Assim, os resultados mostram atividade seletiva sobre as células tumorais, sendo bastante promissores.

Vale ressaltar que as mesmas amostras que apresentaram atividade hemolítica, a saber fração clorofórmio e fração acetato de etila, foram as que apresentaram melhores resultados sobre a inibição da proliferação celular no ensaio MTT, mostrando toxicidade específica nestas amostras.

5.4.3 Atividade hemolítica

A avaliação de extratos com atividade hemolítica é uma ferramenta muito importante, pois vale como um indicador de citotoxicidade e bioatividade, sendo utilizada por vezes como um método de triagem de agentes tóxicos (CANTELI, 2012).

Além do uso de extratos e outras formas farmacêuticas utilizadas pela humanidade, há hoje o interesse no uso de moléculas isoladas. Nesse sentido, a busca por informações acerca dessas moléculas é grande, e o ensaio de avaliação da atividade hemolítica promove uma visão geral da toxicidade, promovendo informação inicial sobre a interação entre a molécula e a célula (KUMAR, XKARTHIK; RAO, 2011).

No geral, as técnicas consistem na verificação de possíveis danos causados por substâncias presentes sobre as células do sistema hematopoético, em especial, os eritrócitos liberando ao meio o pigmento hemoglobina. Muitas são as técnicas utilizadas para a avaliação da atividade hemolítica e muitos são os mecanismos envolvidos, como a solubilização da membrana de eritrócitos e ainda a alteração da permeabilidade de membranas e lise celular (PEQUENO; SOTO-BLANCO, 2006).

Embora muitos sejam os mecanismos envolvidos, em geral as técnicas de verificação de atividade hemolítica consistem em ensaios *in vitro*. Em um momento onde cada vez mais se deseja buscar técnicas alternativas onde não se utilize ou se diminua o número de animais utilizados nas verificações de atividades biológicas, tais métodos são uma excelente alternativa (GANDHI; CHERIAN, 2000).

Para a verificação da atividade hemolítica de *Byrsonima duckeana* o extrato etanólico e as frações hexano, clorofórmio, acetato de etila e a fração remanescente foram submetidas ao teste de atividade hemolítica em tubos e em placas de ágar sangue de carneiro.

No ensaio realizado em tubos nenhuma amostra apresentou atividade hemolítica, que só é considerada quando há hemólise total e não se percebe nenhum botão de hemácia no fundo do tubo. Os resultados estão ilustrados na figura 30.

No ensaio realizado em placas, o extrato etanólico, a fração hexano e a fração remanescente não apresentaram atividade hemolítica. Já a fração clorofórmio apresentou 65,62 % de atividade, quando comparada ao controle positivo, solução de Triton 10%, considerado com 100% de atividade. A fração acetato de etila apresentou atividade hemolítica de 48,6%, resultado menor do que a fração clorofórmio. O solvente utilizado para solubilização das amostras, o metanol, não apresentou atividade hemolítica sobre as amostras. A figura 31, ilustra os resultados encontrados no ensaio. Os halos formados foram medidos e comparados ao controle positivo, onde foi considerado 100% de atividade hemolítica.

Vale ressaltar que o modelo de atividade hemolítica em tubos, considera positivo apenas aqueles resultados onde há hemólise total, ou seja, não há depósito de hemácias e a solução sobrenadante encontra-se totalmente límpida. Já no modelo de atividade hemolítica em placas de ágar sangue, pode-se verificar e considerar hemólise parcial, uma vez que os resultados são comparados, por medição, ao controle positivo utilizado no teste.

A atividade hemolítica encontrada nas frações clorofórmio e acetato de etila, relatadas no modelo de atividade hemolítica em placas de Ágar sangue, pode ser atribuída também a presença de ácido gálico nas amostras, uma vez que a presença deste metabólito foi demonstrada nas análises cromatográficas realizadas neste trabalho, para a fração clorofórmio. O trabalho de Bednarczuk, 2012, avaliou a atividade hemolítica de ácido gálico com resultado positivo.

Além do ácido gálico, deve-se pensar nos demais metabólitos presentes nas amostras testadas.

Saponinas são classicamente estudadas em relação a atividade hemolítica desempenhada por elas, capazes de por vezes, agir com sua função detergente sobre as hemácias, ou através da lise osmótica (PEREIRA *et al.*, 2011). No entanto, outros metabólitos secundários são capazes de causar hemólise, liberando hemoglobina para o meio extracelular.

Compostos fenólicos podem apresentar atividade hemolítica pela oxidação da hemoglobina, formando meta-hemoglobina (PEREIRA *et al.*, 2011).

A grande preocupação da atividade hemolítica dá-se pelo fato da hemoglobina livre no plasma ser prejudicial a saúde causando danos em órgãos vitais tais como fígado, rins e coração (CARVALHO *et al.*, 2007).

O resultados positivos ocorreram nas frações clorofórmio e acetato de etila. Além da presença de ácido gálico, que apresenta atividade hemolítica já descrita, pode-se pensar que compostos mais polares presentes nas amostras possam causar hemólise. As amostras são ricas em compostos fenólicos, capazes de oxidar a hemoglobina formando meta-hemoglobina e causando hemólise como relatado anteriormente.

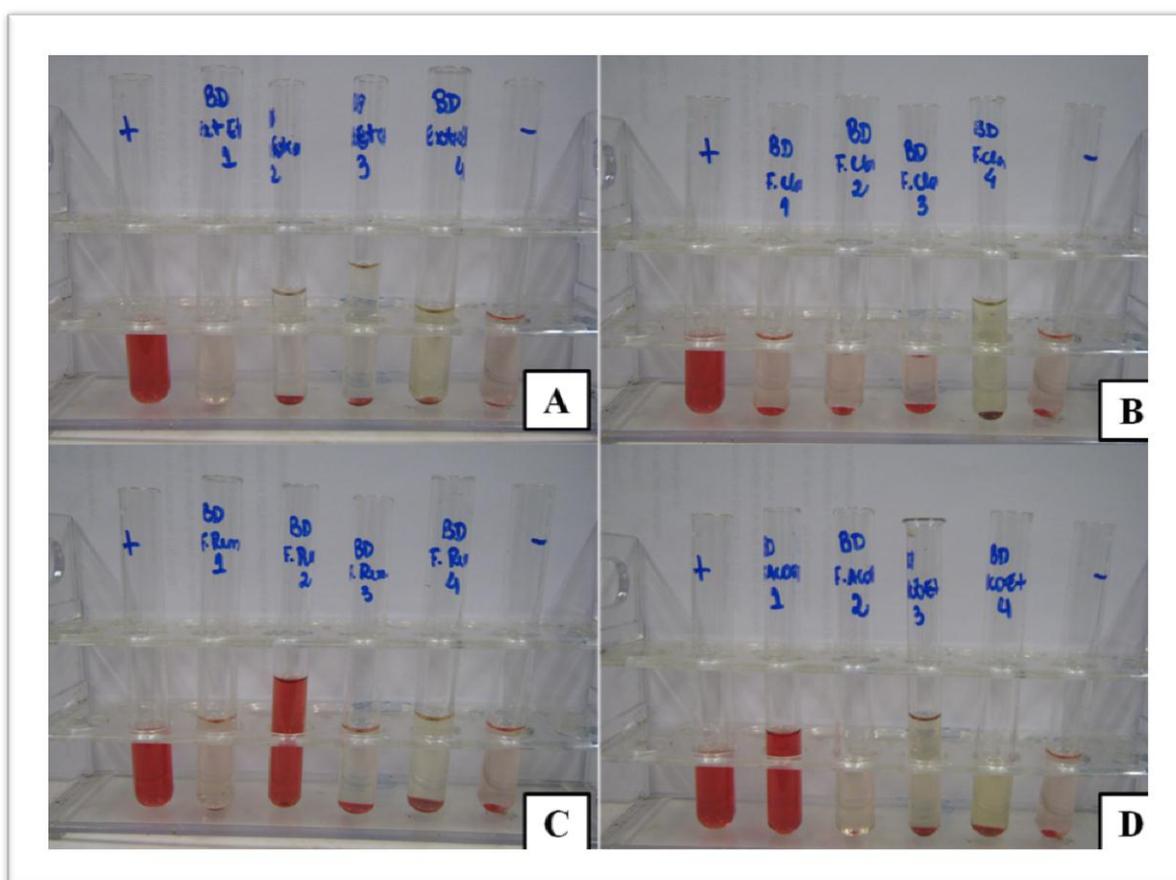


FIGURA 30 – RESULTADO DO ENSAIO DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM TUBOS..

NOTA: O DEPÓSITO DE HEMÁCIAS NO FUNDO DO TUBO E A SOLUÇÃO LÍMPIDA CARACTERIZAM RESULTADO NEGATIVO . A- EXTRATO BRUTO. B- FRAÇÃO CLOROFÓRMIO. C- FRAÇÃO REMANESCENTE. D- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA.

FONTE: O AUTOR, 2014.

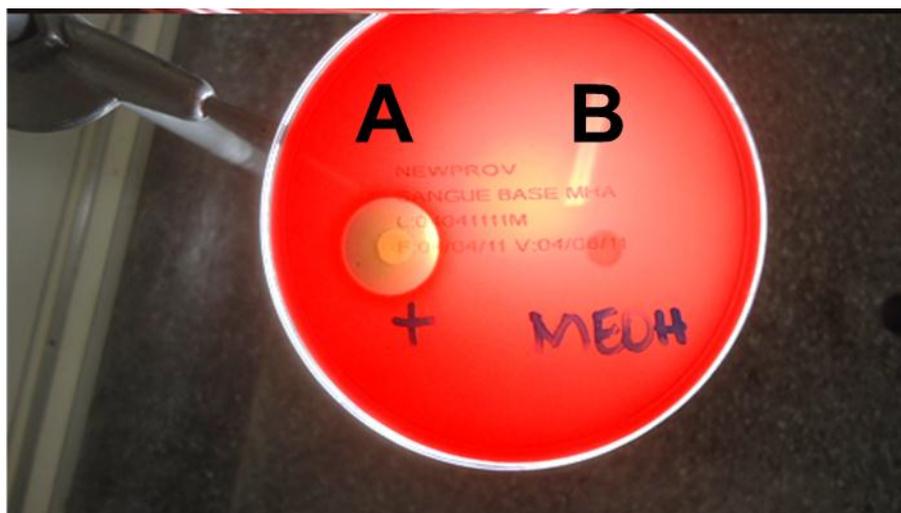


FIGURA 31 – RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE HEMOLÍTICA EM PLACAS DE ÁGAR SANGUE DE CARNEIRO.

NOTA: A- A PLACA DE ÁGAR SANGUE APRESENTA RESULTADO POSITIVO COM FORMAÇÃO DE HALO DE HEMÓLISE PARA CONTROLE POSITIVO EMPREGADO. B- AUSÊNCIA DE HALO COM USO DE METANOL.

FONTE: O AUTOR, 2014.

5.5 Avaliação da atividade antioxidante

Em virtude da grande necessidade de moléculas antioxidantes, do grande potencial antioxidante já avaliado no gênero *Byrsonima*, e dos achados na prospecção fitoquímica realizada, com metabólitos secundários portadores de grupamentos fenólicos, e de atividade antioxidante já descrita na literatura, optou-se por verificar a referida atividade em diferentes modelos.

Espécies reativas de oxigênio - EROS podem causar desordens celulares em especial ao reagir com elementos estruturais celulares como lipídeos, proteínas, carboidratos e ácidos nucleicos. Este efeito contribuiu para o surgimento de doenças da modernidade como diabetes, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, auto-imunes, carcinogênese, mutâgenese e o próprio envelhecimento. As inúmeras doenças relacionadas às reações de espécies reativas de oxigênio reforçam a importância da pesquisa no campo dos antioxidantes, que permitam descobrir substâncias que inibam ou retardem esses processos, ou ainda que reparem os danos causados às células pelas EROS (ANDRADE *et al.*, 2007).

A atividade antioxidante é bem descrita no gênero *Byrsonima*, muitas espécies apresentam essa atividade que pode ser justificada pela riqueza de substâncias fenólicas no gênero, com destaque para os flavonóides.

Sabe-se que o núcleo fenólico presente em substâncias como os flavonóides merece destaque com relação a atividade antioxidante, funcionando como um grande captador de espécies reativas de oxigênio, reduzindo e quelando íons férrico que são catalisadores da peroxidação lipídica (ANDRADE *et al.*, 2007).

O estresse oxidativo tem sido definido como um distúrbio no equilíbrio do corpo entre os sistemas oxidantes e antioxidantes resultando em dano celular, contribuindo para o desenvolvimento de patologias (HASSIMOTTO, 2005).

Dessa maneira, a busca por substâncias com potencial antioxidante vem sendo um dos principais temas de pesquisas, na tentativa de encontrar moléculas capazes de reestabelecer o equilíbrio do corpo, diminuindo as chances do desenvolvimento das mais diversas patologias.

Para avaliação da atividade antioxidante foram testadas as seguintes amostras: Extrato Bruto, Fração Hexano, Fração clorofórmio e Fração Acetato de Etila e Fração Remanescente. As pesquisas acerca do potencial antioxidante das amostras, foi iniciada com a verificação da concentração de fenólicos totais, através do ensaio de Folin Ciocalteu. O interesse pela busca de compostos fenólicos, se dá pela intensa relação entre os compostos fenólicos e a atividade antioxidante. Em seguida, optou-se pelos ensaios de Avaliação da redução do complexo fosfomolibdênio e redução do radical DPPH, por se tratarem de ensaios de fácil execução e boa aplicação em pesquisa de atividade antioxidante em produtos naturais. Foi realizado ainda o ensaio de substância reativas ao ácido tiobarbitúrico, buscando atividade inibidora da peroxidação lipídica. A seguir os resultados de cada ensaio serão apresentados para discussão dos mesmos de maneira integrada.

5.5.1 Determinação de Compostos Fenólicos Totais pelo método Folin Ciocalteu

A tabela 5 expressa os resultados encontrados na determinação de fenólicos totais. Os valores encontrados são expressos em equivalentes de ácido gálico (Eqga/g).

O reagente Folin Ciocalteu é uma solução de íons complexos e poliméricos formados de heteropoliácidos fosfomolibdínicos e fosfotungsticos, que oxida os fenolatos, e os reduz a um complexo azul Mo-W (NEVES *et al.*, 2009).

TABELA 5: RESULTADOS OBTIDOS PELO DOSEAMENTO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS ATRAVÉS DO ENSAIO DE FOLIN CIOCAULTEAU

Amostra	Eqga/g
Extrato Bruto	466,60
Fração Hexano	108,84
Fração Clorofórmio	582,46
Fração Acetato de Etila	743,74
Fração Remanescente	613,29

Os resultados encontrados indicam grande o potencial antioxidante da espécie, dado os altos valores encontrados no doseamento de fenóis totais.

A fração clorofórmio e a fração acetato de etila apresentaram altos valores de compostos fenólicos o que se pode esperar pela maior polaridade das mesmas.

5.5.2 Ensaio da redução do complexo fosfomolibdenio

O método de complexação pelo fosfomolibdênio, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar, 1999, é conhecido como uma maneira simples e barata de se avaliar a capacidade antioxidante total de uma mistura complexa de compostos. Dessa maneira se adequa bem a avaliação de extratos vegetais bem como suas frações e

permite avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO, PINEDA E AGUILAR, 1999).

Assim como esperado através do ensaio de doseamento de fenóis totais, o ensaio da redução do complexo fosfomolibdênio apresentou resultados promissores quanto ao potencial da espécie para uso como antioxidante. Vale ressaltar os resultados encontrados na fração clorofórmio com aproximadamente 60% de atividade em relação a vitamina C. A figura 32 ilustra os resultados encontrados neste ensaio.

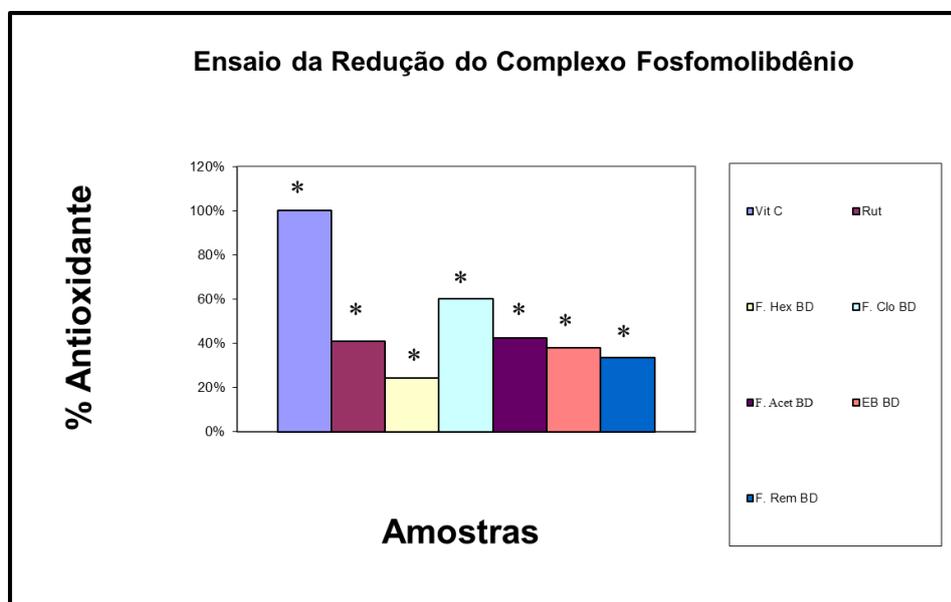


FIGURA 32 - RESULTADOS OBTIDOS NO ENSAIO DE REDUÇÃO DO FOSFOMOLIBDÊNIO PARA EXTRATO BRUTO E FRAÇÃO DE *B. DUCKENANA*.

NOTA: VIT C- PADRÃO DE VITAMINA C, RUT – PADRÃO DE RUTINA, F.HEX BD – FRAÇÃO HEXANO, F. CLO BD – FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, F. ACET BD – FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, EB BD – EXTRATO ETANÓLICO , F. REM BD – FRAÇÃO REMANESCENTE.

No ensaio de verificação de atividade antioxidante através do modelo de redução do Fosfomolibdênio, a fração clorofórmica apresentou maior potencial antioxidante quando comparada as demais amostras testadas. Todas as amostras obtiveram atividade antioxidantes inferior a vitamina C, controle positivo, utilizado nesse modelo de ensaio, porém a fração clorofórmio apresentou atividade maior que

a Rutina, outro controle positivo utilizado no ensaio, enquanto as demais frações apresentaram atividade semelhante.

5.5.3 Avaliação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH

As metodologias mais comuns e de boa execução para o ensaio de verificação de atividade antioxidante, são aqueles que envolvem um radical cromóforo simulando as EROS, sendo o radical livre DPPH um dos mais usados. O radical DPPH é estável, apresenta coloração violeta intensa e ao ser reduzido pelos componentes da amostra teste, sua coloração torna-se amarela proporcionalmente a concentração da substância antioxidante (ANDRADE *et al.*, 2007).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) é um radical livre e estável com o qual compostos vegetais que apresentam potencial atividade antioxidante interagem, permutando os elétrons ou átomos de hidrogênio para o radical livre reduzindo-o. É um método fácil, rápido e muito utilizado para avaliar a capacidade antioxidante de amostras vegetais (KALEGARI, 2009).

Os resultados obtidos no ensaio de DPPH (figura 33) foram interessantes. As frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram destaque com resultados de IC 50% de $6,24 \pm 0,022 \mu\text{g/mL}$ e $8,22 \pm 0,041 \mu\text{g/mL}$ respectivamente. Esses resultados se aproximam do padrão Rutina com IC 50% de $6,01 \mu\text{g/mL}$ e do padrão ácido ascórbico com IC 50% de $4,60 \pm 0,14 \mu\text{g/mL}$.

Valores tão próximos aos padrões utilizados nos ensaios reforçam a capacidade antioxidante da espécie estudada e nos sugerem sua utilidade na terapêutica. O quadro 5 permite observar os resultados encontrados nos dois ensaios realizados, o ensaio de redução do complexo fosfomolibdênio e o resultado encontrado no ensaio de verificação de redução do radical DPPH. Comparando os resultados, ao doseamento de fenólicos totais também realizado, fica fácil inferir que a capacidade antioxidante encontrada nos ensaios está intimamente relacionada com a grande concentração de compostos fenólicos na amostra. Além disso, a presença de ácido gálico não pode ser desconsiderada e deixada a parte quando a

atividade antioxidante tão grande é constatada e o ácido gálico está presente na amostra.

Os resultados obtidos nos ensaios de verificação da atividade antioxidante pela redução do radical DPPH estão expressos nas figuras 33, onde a IC 50% para cada amostra pode ser calculada. Os valores encontrados para cada amostra estão expressos no quadro 5.

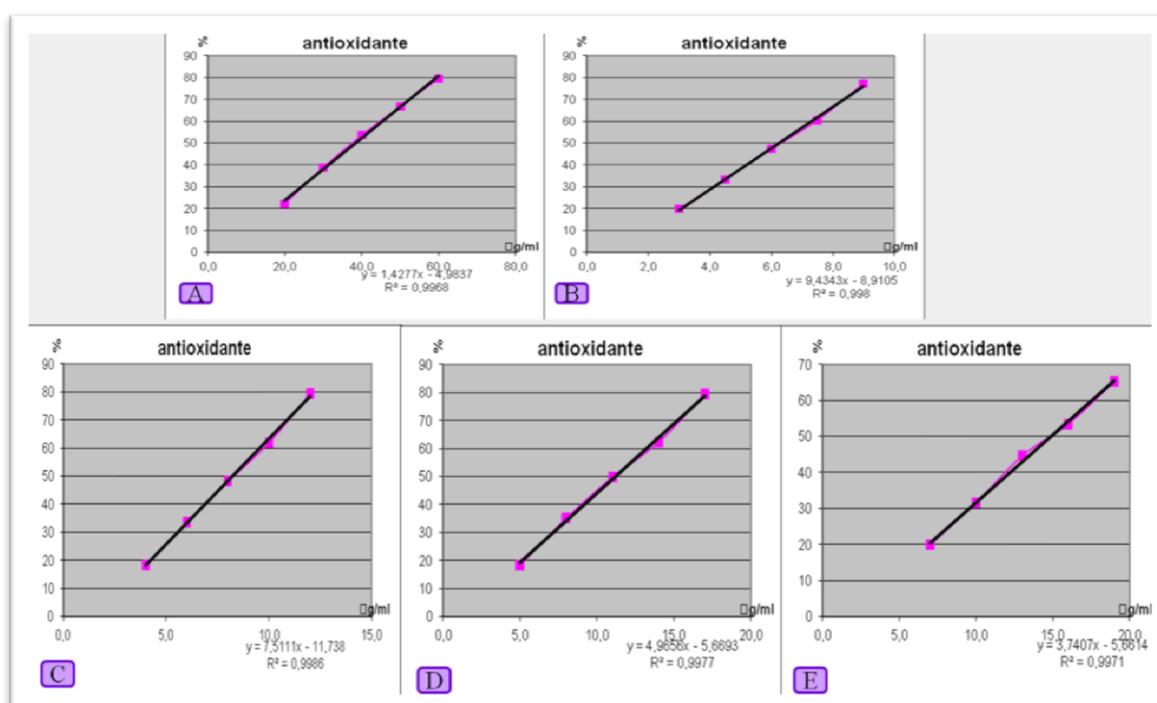


FIGURA 33 - RESULTADOS OBTIDOS NA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NO MODELO DPPH.

NOTA:A- FRAÇÃO HEXANO, B- FRAÇÃO CLOROFÓRMIO, C- FRAÇÃO ACETATO DE ETILA, D- FRAÇÃO REMANESCENTE, E- EXTRATO ETANÓLICO.

No ensaio de verificação da atividade antioxidante do complexo fosfomolibdênio a fração clorofórmio apresentou maior atividade com 60,29%. Tal fato se repetiu no ensaio DPPH onde a amostra com menor IC₅₀ foi também a fração clorofórmio, tal fato pode ser justificado pela presença de ácido gálico na amostra. O ácido gálico apresenta atividade antioxidante bem elucidada e estudada na literatura e está presente na fração clorofórmio, conforme verificado no perfil cromatográfico por CLAE. Vale ressaltar que no modelo fosfomolibdênio o resultado da atividade foi

maior que o padrão utilizado, a rutina, que apresenta potencial antioxidante bem estudado, descrito, é que é um antioxidante bem empregado nos ensaios de verificação de atividade antioxidante naturalmente.

Para que se possa realizar inferência sobre a análise foi construído o quadro abaixo que compara os valores encontrados em dois ensaios antioxidantes realizados:

Amostra	Atividade antioxidante Fosfomolibdênio. (% ± SD)	DPPH (IC50 - µg/mL ± DP)
Fração Hexano	24,20 ± 0,00	38,51 ± 0,09
Fração clorofórmio	60,29 ± 0,01	6,24 ± 0,02
Fração acetato	42,46 ± 0,00	8,22 ± 0,04
Fração Remanescente	33,70 ± 0,016	11,21 ± 0,06
Extrato Etanólico	38,15 ± 0,00	14,88 ± 0,04
Padrão Rutina	40,94 ± 0,01	6,01 ± 0,01
Padrão Vitamina C	100 ± 0,01	4,60 ± 0,14

QUADRO 5: RESULTADOS ENCONTRADOS NOS ENSAIOS DE VERIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE NOS MODELOS FOSFOMOLIBDÊNIO E DPPH.

5.5.4 Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS

A peroxidação lipídica é um dos processos mais importantes do corpo humano, e está associada ao desencadeamento de diversas doenças. Além disso, é um problema encontrado pela indústria alimentícia, pois promove rancificação de óleos e gorduras, gerando a perda de sabor de alimentos e menor aceitação do público. Com isso, é inegável a necessidade de substâncias que inibam ou retardem esse processo. O ensaio TBARS é um ensaio que permite verificar a inibição da peroxidação lipídica pela substância testada. A figura 34, ilustra os resultados

encontrados no ensaio das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS para as amostras testadas.

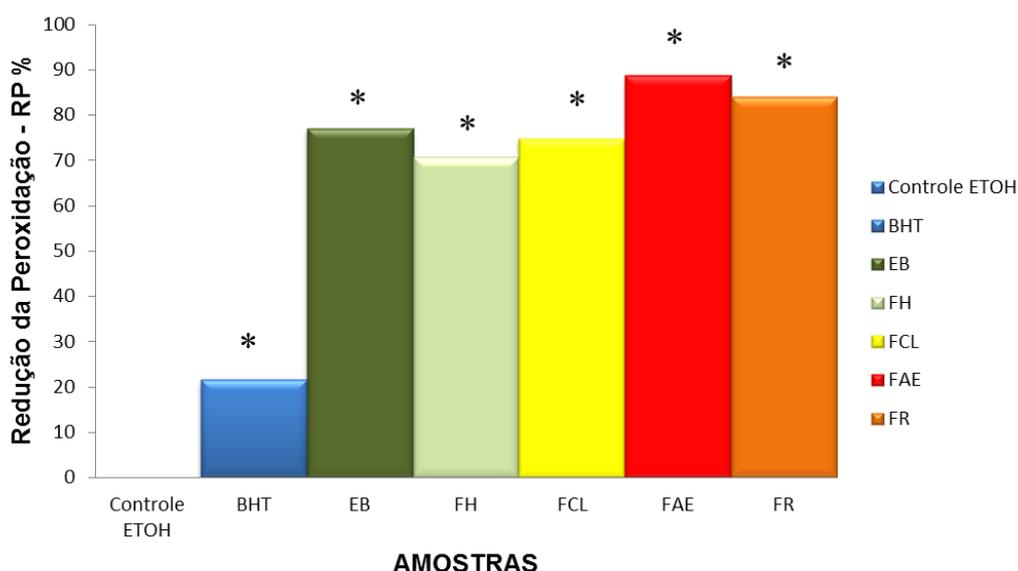


FIGURA 34 – RESULTADOS ENCONTRADOS NO ENSAIO ANTIOXIDANTE MODELO TBARS

NOTA: CONTROLE POSITIVO: BHT. EB: EXTRATO ETANÓLICO. FH: FRAÇÃO HEXANO. FCL: FRAÇÃO CLOROFÓRMIO. FAE: FRAÇÃO ACETATO DE ETILA. FR: FRAÇÃO REMANESCENTE.

Partindo dos resultados encontrados nos ensaios antioxidantes nos modelos Fosfomolibdênio e DPPH, decidiu-se proceder a verificação de atividade inibitória da peroxidação lipídica através deste ensaio. Corroborando com os resultados encontrados nos demais ensaios, *B. duckeana* mostrou ser um agente antioxidante promissor. Todas as mostras testadas apresentaram atividade superior ao BHT, que é o padrão utilizado no teste.

No ensaio DPPH as frações acetato de etila e remanescente apresentaram IC 50 relativamente próximas aos padrões rutina e vitamina C, padrões com já descrita e conhecida propriedade antioxidante.

No ensaio fosfomolibdênio as mesmas frações apresentaram alta atividade antioxidante maior que o padrão rutina, o mesmo aconteceu no ensaio TBARS com destaque também para a fração remanescente. Todas as frações testadas e o extrato bruto apresentaram atividade antioxidante superior ao padrão BHT nesse

ensaio. Dessa forma, é necessário ressaltar o potencial da espécie em inibir a peroxidação lipídica.

Vale ressaltar que as frações com maiores atividades antioxidantes em todos os ensaios testados foram as frações clorofórmio e acetato de etila. Ambas apresentam maior concentração de compostos fenólicos, encontradas no ensaio de doseamento de compostos fenólicos totais. Tal afirmação se reforça nos achados da literatura que afirmam que os compostos fenólicos são compostos com alta atividade antioxidante.

Taninos que podem estar presentes na fração acetato de etila apresentam atividade antioxidante, pois são conhecidos por captarem radicais, interceptando o oxigênio ativo formando radicais estáveis, atuando ativamente no tratamento de doenças causadas pela peroxidação lipídica (SANTOS; MELLO, 2007). Tal afirmação pode justificar os resultados encontrados nos ensaios antioxidantes, inclusive no ensaio de inibição da peroxidação lipídica, com resultados superiores ao padrão utilizado.

Não se pode esquecer o papel inibidor da oxidação dos flavonóides conhecidos pela habilidade em captura e neutralização de espécies oxidantes. Alguns são capazes de se ligar a íons metálicos, impedindo a catalise e formação de radicais livres, são quelantes de ferro, sequestrante de radicais livres, fosfolipases e estimulam enzimas antioxidantes. Alguns flavonóides também atuam na peroxidação lipídica, sendo empregados na indústria de alimentos (ZUNAZZI; MONTANHA, 2006).

Assim, é possível pensar em atividade conjunta das referidas classes de metabólitos secundários como sendo responsáveis pela atividade antioxidante apresentada em diferentes modelos. A grandeza do estudo de plantas medicinais e seus extratos consiste justamente no possível efeito sinérgico das muitas substâncias presentes neles. A ação de taninos e flavonóides possivelmente está ligada aos resultados apresentados. Tais resultados tem utilidade nos mais diversos ramos da indústria. Seja farmacêutica, alimentícia ou cosmecêutica.

5.6 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS

Os ensaios farmacológicos foram realizados com extrato bruto e frações. Diante dos metabólitos secundários encontrados na prospecção fitoquímica, como terpenos, esteroides e flavonóides, todos com atividades descritas na literatura acerca de inibição da dor e de processos inflamatórios, dos resultados encontrados na avaliação antioxidante, e da toxicidade seletiva exibida pelas amostras testadas, tendo atividade apenas de inibição da linhagem celular tumoral HT29 e atividade hemolítica apenas em duas frações, ensaios farmacológicos sobre dor e inflamação foram selecionados para triagem das amostras.

5.6.1 Nocicepção induzida por injeção intraplantar de formalina (2,5%)

O teste da Formalina permite a quantificação da resposta antinociceptiva a partir da observação das respostas motoras do animal em teste. No modelo da formalina duas fases são observadas. A primeira fase começa imediatamente após a administração da formalina e dura os cinco primeiros minutos. A segunda fase se inicia aos 15 minutos posteriores e finda aos 30 minutos após a administração da formalina. Essas duas fases apresentam mecanismos de modulação distintos. A primeira fase é de caráter neurogênico sendo sensível a analgésicos opióides. Já a segunda fase é caracterizada por dor de origem inflamatória, sendo portanto, sensível aos fármacos analgésicos anti-inflamatórios (LAPA *et al.*, 2008).

O modelo da formalina é uma ferramenta de grande importância nos testes farmacológicos, pois auxilia na diferenciação entre o efeito analgésico e anti-inflamatório corriqueiramente confundido nos relatos populares de usos de extratos vegetais (LAPA *et al.*, 2008).

Quanto ao teste utilizando formalina para induzir nocicepção foram avaliadas duas fases do experimento separadamente, a primeira se destina a fase de dor neurogênica, observada dentro dos primeiros cinco minutos. Os resultados são apresentados na figura 35.

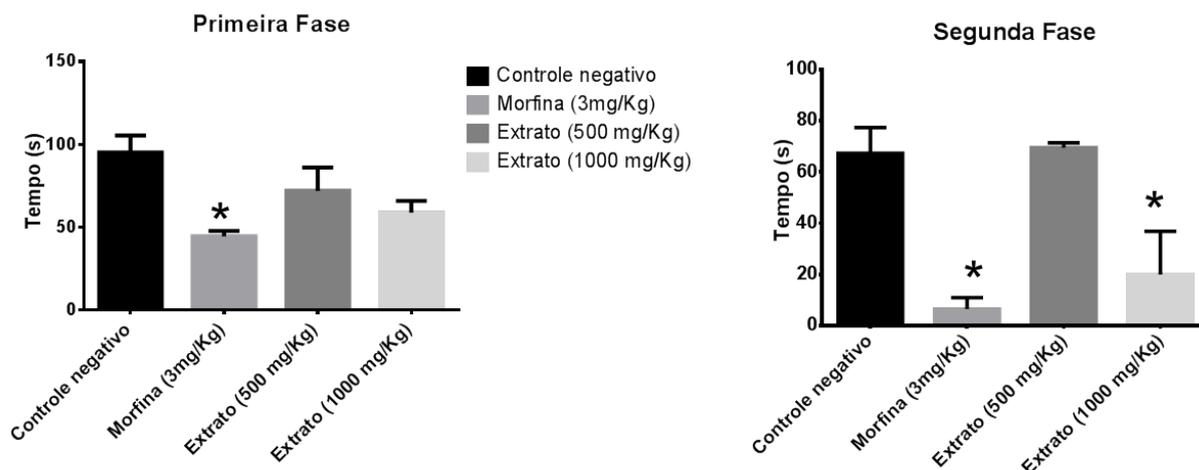


FIGURA 35. EFEITO ANTINOCICEPTIVO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. DUCKEANA* EM RELAÇÃO À PRIMEIRA E SEGUNDA FASE DA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPLANTAR DE FORMALINA 2,5% EM CAMUNDONGOS.

NOTA: CONTROLE NEGATIVO: ANIMAIS TRATADOS COM ÁGUA; CONTROLE POSITIVO: ANIMAIS TRATADOS COM MORFINA. DADOS APRESENTADOS EM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MÉDIA. PARA PRIMEIRA FASE (n=6) E PARA SEGUNDA FASE (n=4).

Os resultados obtidos na fase de dor neurogênica (1A) mostram que os animais do grupo controle negativo apresentaram uma resposta nociceptiva de $95,17 \pm 25,12$ segundos, enquanto os grupos testes apresentaram uma resposta de $72,00 \pm 34,47$ segundos na dose de 500mg/kg e $58,83 \pm 17,36$ segundos para 1000mg/kg. O grupo controle positivo apresentou uma resposta de $44,50 \pm 10,61$ segundos.

Na fase de dor inflamatória (segunda fase) os animais do grupo controle negativo e controle positivo apresentaram uma reação nociceptiva de $67,25 \pm 20,21$ segundos e $6,50 \pm 8,96$ segundos.

As doses testadas apresentaram como resposta na dose de 500mg/kg $69,50 \pm 3,70$ segundos e $20,00 \pm 33,67$ segundos para 1000mg/kg. Apenas a dose mais alta testada apresentou significância estatística.

Desta maneira, pode-se inferir que houve uma atividade inibitória da dor de origem inflamatória para a dose de 1000 mg/kg.

5.6.2 Peritonite induzida por carragenina 1%

A carragenina induz mecanismo de hipernocicepção por ativação sequencial de citocinas liberadas pelas células residentes e pelas células que migram ao sítio inflamatório, desta forma, nociceptores são sensibilizados e o menor estímulo, mesmo que não doloroso é capaz de gerar dor. Assim, os neurônios nociceptores são sensibilizados e mediadores da inflamação, como por exemplo, as prostaglandinas E₂ são capazes de potencializar a sensibilização. As evidências deixam claro, que a dor causada pelo processo inflamatório diminui com anti-inflamatórios. Baseando-se na ação dos anti-inflamatórios não esteroides e esteroides admite-se então que a liberação de mediadores da inflamação como prostaglandinas são responsáveis pela potencialização da dor no processo inflamatório, uma vez que a utilização de substâncias que inibem a produção destes, diminui a dor (ORLANDI *et al.*, 2011).

Diante do resultado encontrado no ensaio da Formalina, com atividade do extrato na segunda fase do ensaio, relacionada a inibição da dor de origem inflamatória, decidiu-se avaliar o efeito do mesmo sobre o processo inflamatório, mais especificamente em um dos componentes do processo inflamatório, a migração leucocitária, *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson foi avaliada no teste da peritonite induzida por carragenina.

A carragenina é um potente agente flogístico (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962) e sua administração por via intraperitoneal, induz resposta inflamatória. Os leucócitos recrutados ao sítio da inflamação foram contabilizados para avaliação de um possível mecanismo sobre atividade antiinflamatória.

Os resultados da contagem de leucócitos totais podem ser visualizados na figura 36.

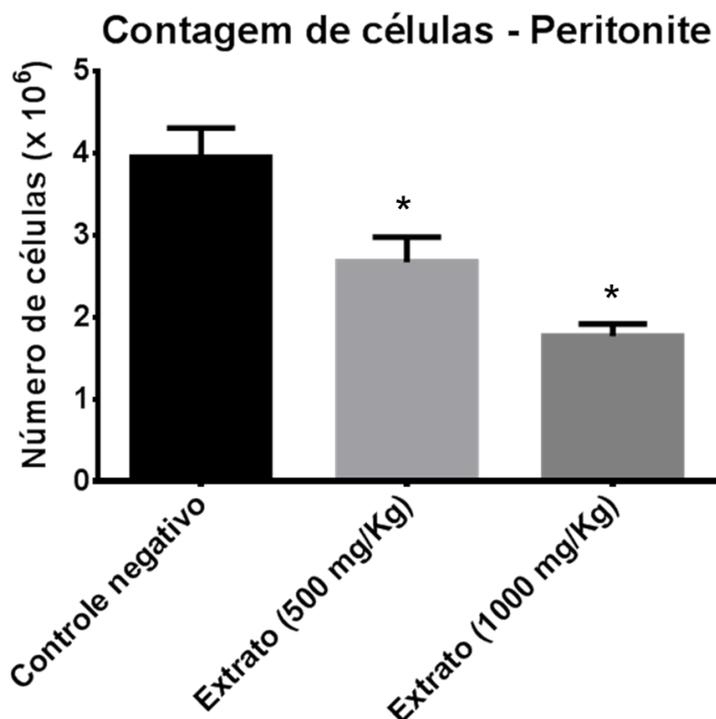


FIGURA 36. EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. DUCKEANA* SEGUIDA DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE CARRAGENINA 1% EM CAMUNDONGOS. CADA GRUPO REPRESENTA A MÉDIA DA CONTAGEM DE LEUCÓCITOS OBTIDOS POR LAVAGEM PERITONEAL DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E DOS TRATADOS (N=6). DADOS APRESENTADOS EM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MÉDIA.

Os resultados da figura 36 mostram que o número de leucócitos que migraram para o sítio de inflamação, dentro de quatro horas, para o grupo controle negativo foi de $3,95 \times 10^6 \pm 0,90$ células enquanto que para a dose de 500mg/kg o valor foi de $2,67 \times 10^6 \pm 0,80$. Esses valores representam uma queda de 32,41% em relação ao controle negativo. Após análise estatística, através de ANOVA e teste de Tukey, considerando $p \leq 0,05$, observou-se significância estatística do dado. Para a dose de 1000mg/kg, o número de células que chegou ao sítio inflamatório foi de $1,77 \times 10^6 \pm 0,4$, representando uma queda de 55 em relação ao controle negativo. As duas doses promoveram diminuição do número de leucócitos recrutados ao local da inflamação e foram estatisticamente significativas.

A observação da diminuição de células recrutadas ao sítio inflamatório é um mecanismo de atividade antiinflamatória. Quando o processo inflamatório se inicia no corpo, muitos eventos são deflagrados incluindo entre eles o recrutamento celular ao sítio inflamatório (CORRÊA-CAMACHO; DIAS-MELICIO; SOARES, 2007)

Assim, o extrato bruto controla um importante evento do processo inflamatório, a migração leucocitária, o que pode cooperar para inferências acerca de sua atividade farmacológica sobre dor e inflamação.

5.6.3 Determinação do extravasamento de proteínas no exsudato peritoneal

Também foi realizada a determinação das proteínas totais presentes no exsudato peritoneal. Os resultados obtidos estão apresentados na figura 37.

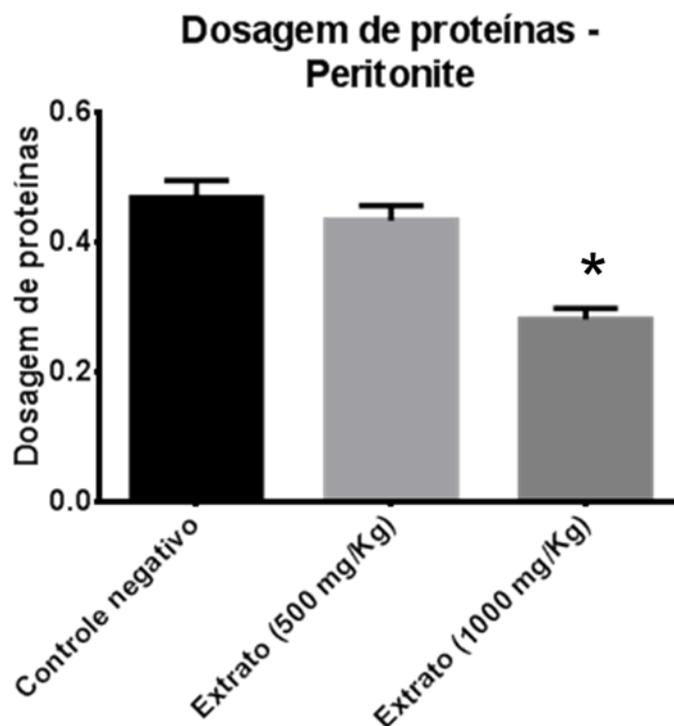


FIGURA 37 - EFEITO CAUSADO PELA ADMINISTRAÇÃO ORAL DO EXTRATO ETANÓLICO DE *B. DUCKEANA* NO EXTRAVASAMENTO DE PROTEÍNAS PARA O EXSUDATO PERITONEAL INDUZIDA POR INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE CARRAGENINA 1% EM CAMUNDONGOS. CADA GRUPO REPRESENTA A MÉDIA DA DETERMINAÇÃO OBTIDA DA LAVAGEM PERITONEAL DOS ANIMAIS DO GRUPO CONTROLE E DOS TRATADOS (N=6). DADOS APRESENTADOS EM MÉDIA E DESVIO PADRÃO DA MÉDIA.

A absorvância de proteínas totais no grupo controle foi de $0,47 \pm 0,059$. Na dose de 500 mg/kg houve uma diminuição pouco significativa para $0,43 \pm 0,061$ de absorvância. Na dose de 1000 mg/kg houve uma queda mais pronunciada, onde a absorvância detectada foi de $0,28 \pm 0,044$. Após análise estatística, apenas a dose de 1000 mg/kg, apresentou significância.

Assim, o tratamento com extrato etanólico resultou em um menor recrutamento de leucócitos ao sítio inflamatório. Porém a diminuição do extravasamento de proteínas foi pronunciada apenas na dose mais alta. Os resultados permitem a inferência de que o extrato tem atuação no controle de eventos agudos inflamatórios como o recrutamento celular, sem atuar ativamente no extravasamento proteico.

A peritonite induzida por carragenina, inicia resposta inflamatória, com exsudação, infiltração leucocitária, e liberação de mediadores químicos,

responsáveis pelos sinais cardinais da inflamação, o edema, a dor, o aquecimento, a vermelhidão e a perda de função (LIMA *et al.*, 2012).

Já os mediadores químicos liberados pelos leucócitos estão mais relacionados, por exemplo, a hipersensibilização das fibras nervosas, levando a hiperalgesia.

A observação dos resultados encontrados nos ensaios de nocicepção induzida por formalina, com atividade sobre dor de origem inflamatória, somado a diminuição do recrutamento celular, observada pela contagem de leucócitos, levaram a avaliação da atividade do extrato sobre dor também das frações originadas da partição fitoquímica realizada, visando encontrar uma fração enriquecida em substâncias capazes de atuar no arsenal terapêutico. Para isso, os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o ensaio da placa quente foram utilizados.

5.6.4 Ensaios farmacológicos realizados na Universidade Federal do Amazonas - UFAM

Antes da administração nos animais, o extrato bruto e as frações foram submetidos ao teste solubilidade para determinar o solvente ou mistura de solventes, adequados para administração oral em animais, seria utilizado nos testes *in vivo*. Após algumas tentativas, concluiu-se que o Tween 20, seguido de emulsificação com soro fisiológico, foi a melhor forma de solubilizar as amostras, na proporção aproximada de 0.5 ml de Tween 20 por cada grama do extrato.

5.6.4.1 Toxicidade aguda

Um dos aspectos mais importantes das análises farmacológicas reside em conhecer a toxicidade de substâncias. Assim, visando analisar a toxicidade do extrato bruto e das frações de *B. duckeana*, a avaliação da toxicidade aguda foi realizada. Também foram observadas possíveis alterações comportamentais dos animais ao longo das primeiras horas de observação do ensaio, configurando o screening hipocrático.

Não houve mortes nos grupos dos animais que receberam o extrato etanólico bruto e as frações, por esse motivo a dose letal a 50% (DL₅₀), não pode ser calculada. Também não foram observados sinais macroscópicos de toxicidade em nenhum dos animais. Sendo assim, assume-se que as amostras testadas podem causar alguma toxicidade somente em doses acima de 2000 mg/kg, portanto, podem ser consideradas seguras para administração pela via oral. Esse resultado reafirma a observação de Guilhon-Simplicio e Pereira (2011) de que *Byrsonima* spp. são relativamente seguras para estudos *in vivo*, reforçando o potencial farmacológico promissor do gênero.

Somando os resultados encontrados nas análises de toxicidade realizadas neste trabalho é possível traçar um panorama geral de toxicidade das amostras testadas.

Não houve toxicidade no modelo de *A. salina*, modelo rotineiramente utilizado para triagem de substâncias tóxicas. O mesmo ocorreu no ensaio de toxicidade aguda, não sendo possível nos dois ensaios o cálculo da CI 50 e da DL 50. No entanto, pode-se pensar em toxicidade seletiva ao se avaliar os achados apresentados na atividade hemolítica no modelo de placas de ágar sangue e também no ensaio de viabilidade celular, onde as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram toxicidade.

Vale ressaltar que os modelos de *A. salina* e toxicidade aguda são modelos de avaliação preliminares, embora sejam de extrema valia. Para que se possa inferir com segurança acerca da toxicidade das amostras testadas, novos ensaios são necessários como a avaliação da toxicidade nos modelos de toxicidade sub crônica e crônica.

Dentro dos critérios avaliados, nas condições testadas, as amostras são seguras para uso. A ausência de alterações comportamentais e fisiológicas no ensaio hipocrático também é um importante achado acerca da seguridade das amostras testadas.

5.6.4.2 Ensaio das contorções abdominais

A administração peritoneal de ácido acético promove a liberação de muitos agentes inflamatórios endógenos pelas células que residem na cavidade peritoneal, como as cininas, óxido nítrico, interleucinas, sendo responsáveis pela nocicepção, mas também responsáveis pela aumento da permeabilidade vascular, da migração leucocitária, que são pontos importantes da resposta inflamatória (LONGHI-BALBINOT *et al.*, 2012).

O ácido acético é um bom estímulo para que se avalie a ação das amostras com objetivo de triagem, pois é capaz de produzir resposta onde a intensidade depende de vários eventos relacionados a nocicepção (LAPA; 2008).

No modelo testado, os resultados referentes as frações de maior polaridade, ou seja, extraíveis por acetato de etila e clorofórmio, apresentaram maior atividade.

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético está associado a presença de substâncias com ação analgésica central ou periférica, sendo os mecanismos de ação os mais variados (LAPA; 2008).

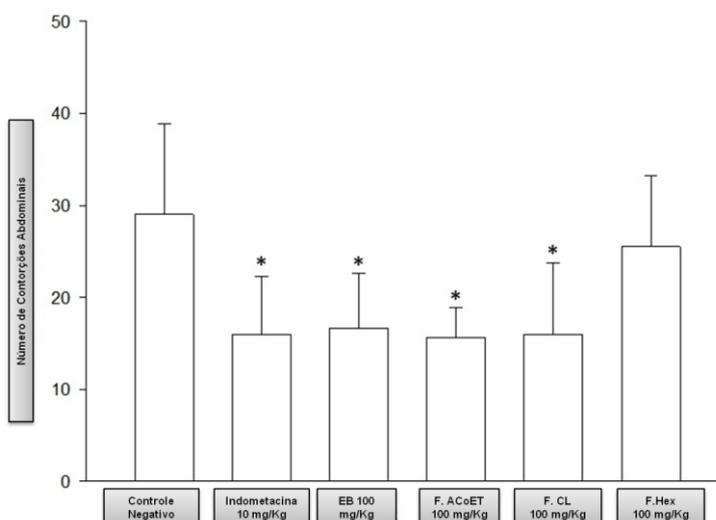


FIGURA 38. CONTAGEM DAS CONTORÇÕES ABDOMINAIS. VALOR DE P VERSUS CONTROLE NEGATIVO: * $P < 0,05$.

5.6.4.3 Ensaio da placa quente

Partindo dos resultados promissores encontrados no ensaio das contorções abdominais, onde as frações acetato de etila e clorofórmio, apresentaram maior atividade, e sem diferença estatística significativa, a fração acetato de etila foi selecionada para o prosseguimento do trabalho, pela conveniência da solubilidade e de administração em animais de experimentação, visto que o clorofórmio é um solvente clorado, também visando minimizar o uso de animais de experimentação.

Diante da boa atividade sobre o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, optou-se por avaliar a ação antinociceptiva em mais um modelo. Como o mecanismo declarado por este modelo utilizado, se refere a variadas possibilidades, sendo de ação central ou periférica, o ensaio da placa quente foi escolhido por estar associado a resposta operante de integração central (LAPA *et al.* 2008).

A partir daí foram selecionadas três doses suficientemente espaçadas para comprovação do potencial analgésico da amostra, 5, 50 e 200 mg/kg, que foram analisadas no teste da placa quente.

Assim, após a colocação do animal sobre uma superfície aquecida a mais de 50 °C observa-se uma resposta característica de dor, onde o animal troca rapidamente o apoio dos pés (“sapateia”), levanta ou lambe uma das patas. Ao se cronometrar o tempo de latência para o aparecimento dessa resposta após a administração de alguma droga, pode se ter um indicativo de sua atividade analgésica (LAPA *et al.* 2008).

Neste estudo, a dose de 200 mg/kg da fração acetato de etila apresentou atividade significativa em relação ao controle negativo em todos os tempos analisados. Nos tempos de 90 e 120 minutos, todas as doses testadas apresentaram atividade analgésica. Nenhuma das doses apresentou diferença em relação ao controle positivo (indometacina).

O ensaio da placa quente é um ensaio específico de ação antinociceptiva central, onde agentes opióides exercem sua atividade por receptores de via supra espinhal e espinhal (ORLANDI *et al.*, 2011).

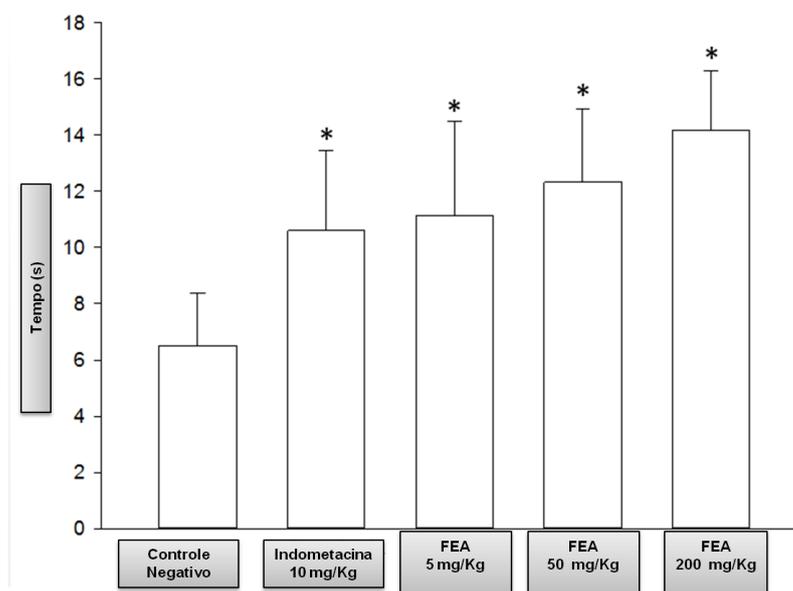


FIGURA 39 - MÉDIA DO TEMPO DE LATÊNCIA PARA RESPOSTA AO ESTÍMULO DOLOROSO, 90 MINUTOS APÓS A ADMINISTRAÇÃO DAS DROGAS. VALOR DE *P* VERSUS CONTROLE NEGATIVO: *P* < 0,05.

A fração acetato de etila apresentou atividade analgésica equivalente à da droga padrão, mesmo com a menor dose testada, 5 mg/kg. Essa dose é metade da dose utilizada de indometacina, enfatizando que a mesma é uma promissora fonte de substâncias com atividade analgésica.

Assim, o extrato bruto atua diminuindo a dor de origem inflamatória, e atua em eventos importantes do processo inflamatório, como o recrutamento celular e o exsudato peritoneal. Além disso, as frações clorofórmio e acetato de etila apresentaram resultados promissores nos modelos de contorções induzidas por ácido acético e no ensaio de placa quente, ambos mais relacionados a atividade analgésica.

A atividade apresentada nos ensaios de contorções abdominais induzida por ácido acético somada ao resultado encontrados no ensaio da placa quente, permite inferir que há um efeito sobre a nocicepção das amostras testadas, com especial atividade para a fração acetato de etila. Tal efeito pode estar associado a grande concentração de compostos fenólicos, relatadas anteriormente, no ensaio de Fenólicos Totais. A ação da fração acetato de etila nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante, deixam claro seu potencial como fonte de substâncias antioxidantes, até mesmo inibindo a peroxidação lipídica. Sabe-se que as EROs são sim, importantes indutores da inflamação e do processo álgico e a capacidade inibitória desta fração e ainda das demais, podem ser responsáveis pela atividade inibitória da dor e inflamação apresentada nos ensaios farmacológicos.

Diante dos resultados encontrados no doseamento de fenóis, com a riqueza de compostos fenólicos presentes na espécie, na riqueza de metabólitos secundários encontrados na prospecção fitoquímica preliminar, com a presença de flavonoides e terpenos com atividade antiinflamatória já descrita na literatura (ORLANDI *et AL.*, 2011), e da atividade antioxidante encontrada em todos os modelos testados, incluindo no modelo de inibição da peroxidação lipídica – TBARS, é possível concluir que a atividade antiinflamatória e analgésica encontrada nos modelos testados pode estar relacionada com a atividade antioxidante presente na espécie.

A ação antioxidante do extrato e das frações pode contribuir com a atividade antiinflamatória e antihiperalgésica das amostras (GUILHON-SIMPLICIO *et AL.*, 2012). Além disso, a peroxidação lipídica também está associada a agravação dos

quadros inflamatórios, outro ponto onde as amostras testadas tiveram atuação de forma positiva.

Tais fatos, somam-se a premissa de que os maiores resultados encontrados para atividade antioxidante foram, nas amostras com maior concentração de compostos fenólicos, mais polares e com maior atividade sobre dor e inflamação, a saber, as frações clorofórmio e acetato de etila.

A fração clorofórmio é fração rica em metabólitos secundários do tipo flavonóides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos e cumarinas, enquanto estão presentes na fração acetato de etila flavonóides, taninos, xantonas, ácidos triterpênicos, saponinas e outros compostos fenólicos em geral (FILHO; YUNES, 1998).

A fração acetato de etila a qual obteve maiores valores no ensaio das contorções abdominais induzidas por ácido acético e por isso foi selecionada para o ensaio da placa quente, onde obteve resultados positivos em todas as concentrações testadas, é rica em flavonóides e taninos, metabólitos esses encontrados na prospecção fitoquímica e que podem isoladamente ou em conjunto serem os responsáveis pelos resultados positivos encontrados.

A ação antiinflamatória e cicatrizante dos taninos é encontradas em estudos, onde são relatadas a formação de complexo tanino proteína ou polissacarídeo. Efeito antidematogênico já foi verificado para taninos assim como o efeito bloqueador da hialuronidase ativada e da degranulação de mastócitos (SANTOS & MELO, 2007).

Já o efeito dos flavonóides sobre a inflamação é bem descrito. Atribui-se em geral a atividade antiinflamatória dos flavonóides sobre a inibição da COX e ainda a 5-lipoxigenase. Há ainda relatos de inibição da granulação tecidual, inibição da permeabilidade vascular induzida por histamina e formação de granuloma. Não se pode negar a atividade antioxidante dos flavonóides que conjuntamente com a capacidade inibidora enzimática, atua como anti-inflamatório (ZUNAZZI; MONTANHA, 2007)

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho estudou uma planta nativa da Amazônia objetivando realizar triagem de suas propriedades biológicas e farmacológicas e conhecer seus principais constituintes químicos. Tal fato se justifica pela ausência de estudos com a espécie e a grandeza dos resultados obtidos em estudos de outras espécies do mesmo gênero.

Além disso, o estudo da espécie *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson vem a somar com estudos de espécies da região Amazônica, região de grandezas superlativas em relação ao número de espécies animais e vegetais e ainda não amplamente estudada como merece.

Dessa maneira, o estudo de plantas da flora amazônica vem a contribuir para o desenvolvimento do Brasil no campo das pesquisas, e também reforça os laços entre a sociedade e a Academia, uma vez que o início da pesquisa acerca das atividades biológicas desse vegetal teve partida nos relatos e estudos realizados com outras espécies do gênero *Byrsonima*, presente também na região Amazônica brasileira, acerca das atividades sobre a inflamação pela população cabocla amazonense.

A presença de flavonoides, esteroides, terpenos e taninos, permite inferir que trata-se de uma espécie rica em metabólitos secundários, que podem fornecer moléculas que contribuam para ao arsenal terapêutico. Tal riqueza permitiu delinear testes biológicos ao longo do projeto, e permite sugerir duas estruturas presentes nas folhas de *Byrsonima duckenana*, a saber: ácido gálico e friedelina.

A riqueza de substâncias conta ainda com o que se pode chamar de baixa toxicidade da espécie que não apresentou toxicidade frente ao microcústáceo *Artemia salina*, atividade hemolítica apenas nas frações Acetato de etila e Clorofórmica e citotoxicidade seletiva apenas para a linhagem celular HT29. De fato, tais resultados são de extrema valia, quando somados a ausência de toxicidade, na doses testadas, nos ensaios de toxicidade aguda. São necessários outros ensaios *in vivo* e *in vitro* para que se possa concluir acerca da toxicidade da espécie, porém os achado iniciais indicam baixa toxicidade e resultados interessantes frente a linhagem HT29, podendo a espécie ser um promissor agente terapêutico antineoplásico.

Vale ainda ressaltar as excelentes atividades antioxidantes encontradas em todos os modelos testados, em especial, com atividade inibitória da peroxidação lipídica, com aplicações na indústria farmacêutica, mas também com aplicações na indústria alimentícia, inibindo as rancificações, tão importantes para o ramo.

As atividades farmacológicas mostraram que embora o extrato bruto não tenha apresentado atividade sobre dor e inflamação tão destacável, a fração acetato de etila e clorofórmio apresentaram excelentes resultados nos ensaios de contorção abdominal, sendo por isso a fração acetato levada ao ensaio da placa quente, onde apresentou resultados semelhantes ao controle positivo utilizado no teste.

Assim, a espécie se mostra extremamente promissora com aplicações na indústria de cosméticos, farmacêutica e alimentícia, todas essas sedentas por substâncias novas com potencial antioxidante, que possam tornar seus produtos mais estáveis, e sanar os males causados pelo processo oxidativo no corpo humano, tais como o envelhecimento celular, a aterosclerose, o diabetes e outros.

Os resultados obtidos na triagem toxicológica *in vivo* e *in vitro* demonstram se tratar de uma espécie de baixa ou nenhuma toxicidade, sendo necessários outros ensaios para que se possa garantir a segurança do seu uso.

Novas moléculas com potencial antitumoral estão sendo buscadas no mundo todo, *Byrsonima duckeana* mostrou ser uma possível fonte dessas moléculas sendo ativa em duas frações.

Dessa maneira, o presente estudo realizou triagem biológica e farmacológica sobre o extrato etanólico e frações da folhas de *Byrsonima duckeana*, sendo os resultados positivos e promissores como um agente antioxidante, que atua sobre inflamação e dor, com baixa toxicidade e que apresenta moléculas com potencial farmacológico.

O uso de espécies vegetais é uma das práticas mais antigas da humanidade. O estudo de plantas promove a aproximação do homem e o meio ambiente e permite que pensemos em estratégias de consumo de espécies de forma sustentável.

As farmácias vivas presentes nas comunidades mais distantes do país, onde a dificuldade logística para a chegada de recursos terapêuticos é grande, reforça a premissa de que o reino vegetal ainda tem muito a oferecer ao ser humano para o abastecimento de seu arsenal terapêutico. Nesse sentido, a Academia e o meio

ambiente ainda podem se aproximar, partindo e aprimorando suas pesquisas com espécies vegetais, com os animais e minerais.

Durante muitos anos a fitoquímica encarregou-se apenas do isolamento e identificação de constituintes químicos. Tal função foi de extrema valia, pois forneceu subsídios químicos para o desenvolvimento de moléculas sintéticas que hoje são utilizadas na clínica. Entretanto, hoje é vivenciado um momento onde os estudos não são feitos de maneira isolada.

O estudo de espécies vegetais aliados a ensaios farmacológicos permite que as duas ciências caminhem juntas e deem seus conhecimentos umas as outras, além de permitir a toda a equipe científica envolvida no projeto, que agreguem conhecimentos às suas áreas de atuação e com isso forneçam moléculas novas ou descubram novas funções para aquelas já existentes, contribuindo para o arsenal terapêutico.

8 CONCLUSÃO

O presente estudo avaliou as atividades biológicas das folhas da espécie *Byrsonima duckeana* W.R. Anderson. A espécie se mostrou como um promissor membro do gênero *Byrsonima*, com atividades biológicas interessantes, podendo ser aplicada na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia, dados os resultados antioxidantes encontrados e inibidores da dor e inflamação. Além disso, o estudo de mais uma espécie amazônica agrega saber e conhecimento sobre as espécies da flora brasileira, prática que vem de encontro às propostas de ampliação de conhecimento sobre uso de plantas medicinais para aplicação no Sistema Único de Saúde.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, RM; DAVID, J.P.; DAVID, J.M. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2388-2392, 2005.
- ALBUQUERQUE, R. J. de M., RODRIGUES, L. V.; VIANA, G. S. Análise clínica e morfológica da conjutivite alérgica induzida por ovoalbumina e tratada com chalcona em cobaias. **Acta Cir Bras**, v.19, n.1, p. 43-47, 2004.
- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: Fragilidades e perspectivas. **Rev Bras Farmacog**, v.16, p.678-689, 2006.
- ALMEIDA, V.L. *et al.*,. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. **Quím Nova**, v.28, n.1, São Paulo, jan-fev, 2005.
- ALMEIDA, M. DE F. O. *et al.*, Constituintes químicos e atividade leishmanicida de *Gustavia elliptica*(LECYTHIDACEAE). **Quím Nova**, v.34, n.7,p.1182-1187, 2011.
- ALVES, T. M. A. *et al.* **MEMORIAL DO INSTUTO OSWALDO CRUZ**, v.95, n. 3, p. 367-373, 2000.
- AMOROZO, M. C de M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antonio do Leverger, MT, Brasil. **Acta Botânica. Brasileira**, v.16, n.2, p.189-203, 2002.
- ANDRADE, C.A. *et a.* Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. Ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Rev Bras Farmacog**, v.17, n.2, p.231-235., abr-jun, 2007.
- Andrade CA, Carvalho, JLS, Cunico MM, Lordello ALL, Higaskino CEK, Almeida SCC, Dias JFG, *et al.* Antioxidant and antibacterial activity of extracts, fraction and isolated substances from the flowers of *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don. **Brazil J Pharma Sci** . v.46, p.715-721, 2010.

ARAGÃO, P.C.A., *et al.*, Substâncias isoladas de *Byrsonima Variabilis*. **Quím Nova**, v. 13, n.4, p.254-259, 1990.

ARAÚJO, J.S. **Anatomia foliar de 16 espécies de Malphichiaceae**. Viçosa, 2008. Dissertação (Programa de Pós Graduação em Botânica), Universidade Federal de Viçosa.

AYMOTO, N. M.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Antioxidant Activity of Dietary Fruits, Vegetables, and Commercial Frozen Fruit Pulps. **J Agric Food Chem**, v. 53, p. 2928-2935, 2005.

AZEVEDO, S. K. R. de; SILVA, I. M.. Plantas medicinais comercializadas em mercados e feiras livres no Rio de Janeiro, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 20, n.1, p.185-194, 2006.

BADKER *et al.* Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc. Anna Nery**, v.15. n.1, p.132-139, 2011.

BARATA, L.E.S. A economia verde - Amazônia. **Ciênc Cult**, v.64, n. 3, 2012.

BARBOSA-FILHO *et al.*,. Anty-antiinflammatory activity of alkaloyds: a twenty-century review. **Rev Bras Farmacog**, v.16, n.1, jan-mar, 2006.

BARREIROS, A.L.B.S; DAVID, J.; DABID, J. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím Nova**, v. 29, n.1 p.113-123, 2006.

BALDUCCI-ROSLINDO, E; SILVIO, K.G; MALAGOLI, D.M. Processo de reparo em feridas de extração dentária em camundongos tratados com o complexo *Symphytum officinale* e *Calendula officinalis*. **Revista de Odontologia da Universidade de São Paulo**, v.13, n.2 – São Paulo. abril-junho, 1999.

BEDNARCZUC, V.O. Estudo fitoquímico e atividades biológicas da espécie vegetal *Dicksonia sellowiana* (DICKSONIACEA). Curitiba, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

BENEZAR, R.M.C.; PESSONI, L.A. Biologia Florestal e sistema reprodutivo de *coccolobifolia* (Kunth). Em uma savana amazônica. **Acta Amazônica**, v.36, n.2. p.1569-168. 2006.

BOSE A., *et al.* Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. **Fitoterapia**, v.78, p.515-520, 2007.

BRAGA, R.O.B; DUTRA, D.A.; OLIVEIRA, M.C.M. Incidência geopatológica de Neoplasias no Brasil. **Revista Inspirar**. Movimento e saúde, v.5., n.3. set-out, 2011.

CANTELI, V.C. COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Duranta vestita* Cham., VERBENACEAE. Curitiba, 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

CASTILLO-AVILA, G. M.; GARCÍA-SOSA, K.; PEÑA-RODRÍGUEZ, L. M. Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. **Natural Products Communication**. v.4, n.1, P. 83-86, 2009.

CARVALHO, Wilson Andrade; LEMÔNICA, Lino. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória: Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v.48, n.2, p-137-158, março-abril,1998.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR.**, Brassicaceae. Curitiba, 2001. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

CARVALHO *et al.* Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, n. 2. p.149-152, 2007.

CASTRO, C.M.B D.; AGUIAR, J.L.DE A.; MELO, F.A.D.; SILVA, W.T.F.; MARQUES,E.; SILVA, D.B. Citotoxicidade de biopolímeros de cana-de-açúcar. *An Fac Med Recife*, v.49, n.2. p. 73, 2004.
CORRÊA-CAMACHO C.R; DIAS-MELICIO,L.A.; SOARES, A. M.V.C. Aterosclerose, uma resposta inflamatória. *Arq Ciên Saúde*. v.14, n.1, p;41-48, 2007.

CRUZ, C.T.; BARROS, N.F.; HOEHNE, E.L. Evidências sobre o uso de práticas alternativas e complementares no tratamento convencional de neoplasias mamárias. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.55, n.3, p. 237-246, 2009.

DAVID, J. P. *et al.*, Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v.78, n.215, p.215-218, 2007.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e cultura**, v.55, n. 3. São Paulo. Julho-set, 2003.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5ª ed, volume 1. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1.pdf, acesso em: 2727 de janeiro de 2015;

FIGUEREDO, M.E. *et al.*, Avaliação química e da atividade antidiarréica das folhas de *Byrsonima cinera* D.C. (Malpighiaceae). **Rev Bras Ciênc Farmac**, v.41. n.1., jan.-mar., 2005.

FILHO, V.C.; YUNES, R.A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização de atividades. **Quim Nova**. v. 21, n. 1, 1998.

FREIRE, E. O DE L.; AZEVEDO, R.A. Salvaguarda do acervo documental da Reserva Florestal Ducke- Manaus – AM: registros de uma experiência. **Ciência da Informação** Brasília, v.39. n.2, p.101-114.mai-ago, 2010.

FUNARI, C.S. FERRO, V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Bras Farmacog**, v.15. n. 2. Abr-jun, 2005.

FOGLIO *et al.* Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar. **Multiciência**. Out, 2006.

GANDHI, V.M.; GHERIAN, K.M. Red cell haemolysis test as na *in vitro* approach for the assessment of toxicity of karanja oil. **Toxicol in vitro**, v.14 p.513-516, 2000.

GUILHON-SIMPLICIO, F.; PEREIRA, M.M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (MALPIGHIACEAE). **Quím nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-1041, 2011.

GUILHON-SIMPLICIO F. *et al.*,. Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss (Malpighiaceae). **J Ethnopharmacol**, v. 140, n.2, p.282-286, 2012.

GOMES, M.R. de A. **Anatomia, histoquímica e ultraestrutura de folhas de *Byrsonima basiloba* e *Byrsonima coccolobifolia* (Malpighiaceae)**. Brasília, 2011. Monografia. Consórcio Setentrional de Educação a distância. Curso de Licenciatura em Biologia a distância. Universidade de Brasília/ Universidade Estadual de Goiás.

GORDON, A. *et al.*,. Phenolic constituents and antioxidant capacity of four underutilized fruits from the Amazonian region. **J Agric Food Chem**, v. 59, p. 7688-7699, 2011.

HAEFFNER, R. *et al.*,. Plantas medicinais utilizadas para o alívio da dor pelos agricultores ecológicos do sul do Brasil. *Revista Eletrônica de Enfermagem*, v.14, n.3, p. 596-602. 2012

HASSIMOTO, N.K.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Antioxidant activity of dietary fruits, and commercial frozen fruit pulps. **J Agric Food Chem**, v.53, p. 2928-2935, 2005.

HIGUCHI, C.T. *et al.*,. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. *Quim Nova*, v.31, n.7, p.1719-1721, 2008.

HOPKINS, M.J.G. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil. **Rodriguésia**, v.56 n. 86, p. 9-25, 2005.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em: 22 jan 2015.

JUNIOR, V.F. Veiga; PINTO, A.C., Plantas medicinais: Cura segura? **Quím nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

KALEGARI, M. **COMPOSIÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE**

Rourea induta PLANCH, CONNARACEAE. Curitiba, 2009. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

KALEGARI, M. *et al.*, Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation from leaves of *Rourea induta* Planch (Connaraceae). **RBCF. Rev Bras Ciênc Farm.** v. 47, p. 635-642, 2011.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M.T. de A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.46, n.3, p.199-206, 2006.

KUMAR G, XKARTHIK L, RAO KVB. Haemolytic activity of Indian medicinal plants toward human erythrocytes: an in vitro study. **Elixir Appl. Botany**, v. 40 p. 5534-5537, 2011.

LAPA, *et al.* **Plantas medicinais.** Métodos de avaliação da atividade Farmacológica. Campinas- São Paulo: Unifesp, 2008. p.117-137.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**. v.20, p.297-301, 1992.

LIMA, C.P *et al.* Efeito alelopático e toxicidade frente a artemia salina leach dos extratos dos frutos de euterpe edulis martius. **ACTA BOTANICA BRASILICA**, v.25, n.2, p:331-336, 2011.

Lima DKS *et al.* Evaluation of the antinociceptive, anti-inflammatory and gastric antiulcer activities of the essential oil from *Piper aleyreanum* C.DC in rodents. **J of ethnopharmacol**, v. 14, p. 274-282, 2012.

LIRA, W. M.; SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; **Journal of Medicinal chemistry**, v. 11, n. 11. 2008.

LONGHI-BALBINOT D.T. *et al.* Anti-inflammatory of triterpenes 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene obtained from *Combretum leprosum* Mart & Eich in mice. **J Ethnopharmacol**, 2012; **142**: p. 59-64.

MACIEL, M. A. *et al.* Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quím Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MALONE, MH, ROBICHAUD, R C. A hippocratic screen for pure or crude drugmaterials. **Llooydia**, v.25, p.320–322, 1962.

MAMEDE, M.C.H. 2012. *Byrsonima* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:(<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB084727>). Acesso em: março 2013.

MARINHO, R.O. DE S. Estudo fitoquímico da espécie *Byrsonima sericea* e sua aplicação em dermocosmética. Rio de Janeiro, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MEDZHITOV,R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v.454, n.24, 2008.

MENSOR, L. L., *et al.* Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytoter research**, v.15, p.127-130, 2001.

MICHELIN, D. C. *et al.*,. Antimicrobial activity of *Byrsonima* species (Malpighiaceae). **Rev Bras Farmacog**, v. 18 (Supl.), p. 690-695, 2008.

NEVES, L.C *et al.* Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Braz J Food Technol**. VII BMCFB. Jun, 2009.

MIDDLETON E., KANDASWANMI C. and THEOHARIDES C., The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and Cancer. **Pharmacological Rev**, v. 52, n.4: p 675-751, 2000.

MONTEIRO, J.M *et al.* Taninos: Uma abordagem química a ecologia. **Quim Nova**, v.25, n.5, p. 892-896, 2006.

MORAIS, S.M., *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Rev Bras Farmacog**, v.19 (1B), Jan-Mar, 2009.

MOREIRA, E. A. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. **Tribuna**

Farmacêutica, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. *Nature*. v. 420, 2002.

NEVES, S.M.; CARPES, A.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. *Braz J Food Technol*. VII BMCFB. Jun. 2009.

NIERO, R., MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: YUNES, R.A., FILHO, V.C. **Química de produtos naturais novos fármacos e a moderna farmacognosia**. Universidade do Vale do Itajaí, 319p, 2009.

NUCCI, C., *et al.* Oleaginous extract from the fruits *Pterodon pibescens* Benth induces antinociception in animal models of acute and chronic pain. **J Ethnopharmacol**, v.143, p.170-178, 2012.

NUNES, P.M. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas do óleo da semente de *Citrus sinensis* (L.) Osbeck e sua aplicação na área cosmética**. Curitiba, 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

OLIVEIRA, D.W.C., *et al.* Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Rev Ciên Farm Básica Apl**, v. 28, n.3, p. 241-249, 2007.

OLIVEIRA, A.C. *et al.*,. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Quím Nova interativa**, v.32, n.3, 2009.

OLIVEIRA, V.M.A. *et al.*,. *In vitro* screening of Amazonian plants for hemolytic activity and inhibition of platelet aggregation in human blood. **Acta Amazônica**, v. 39. n.4, p.973-980, 2009.

ORLANDI L., *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **J Ethnopharmacol**, v.137: p 1469-1476, 2011.

PAIVA, E dos S., *et al.* Manejo da dor. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.46, n. 4. P. 292-296. Jul-ago, 2006.

PERAZA-SÁNCHEZ, S. R. *et al.*, Leiscmanicidal evaluation of extracts from native plants of yucatan peninsula. **Fitoterapia**, v.78, n. 315, 2007.

PEREIRA, L.L.S., *et al.*, Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n.4, p. 367-372, 2011.

PERES, L.A.B. *et al.*, Padronização do teste do MTT em modelo de preservação a frio como instrumento de avaliação da viabilidade celular renal. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v.30, n.1, p. 48-53. 2008.

PEQUENO, N.F; SOTO-BLANCO, B. Toxicidade *in vitro* de plantas tóxicas. Avaliação do teste de ação hemolítica. **Acta scientia Veterinariae**, v.31, n. 1, p. 45-48, 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M.; Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, v.269, p.337-341, 1999.

POZHARITSKAYA, O.N. *et al.*, Anti-inflammatory activity of a HPLC-fingerprint aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartite* L. **Phytomedicine**, v.17, p. 463 – 468, 2010.

RAMALHO, V.C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quím Nova**, v. 9, n. 4, p. 755-760, 2006.

RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev Bras Farmacog**, v.11, n.2, p.57-69, 2001.

REZENDE, E.A; RIBEIRO, M.T.F. Conhecimento tradicional, plantas medicinais e propriedade intelectual: biopirataria ou bioprospecção? **Revista brasileira de plantas medicinais**, v.7, n.3, p.37-44, 2005.

RITTER, M.R; SOBIERAJSKI, G.R, SCHENKEL, E.P; MENTZ, L.A. Plantas usadas como medicinais no município de Ipê, R.S, Brasil. **Rev Bras Farmacog**. v.12, n.2, p.51-62, jul-dez. 2002.

RUFINO, M.SM. *et al.*,. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, v.121. p. 996-1002. 2010.

RUVIARO, L. F.; FILIPPIN, L.I. Prevalência da dor crônica em uma Unidade Básica de Saúde em cidade de médio porte. **Revista Dor**, v.13, n.2, p. 128-131, 2012.

ROGERO, S.O; LUGÃO, A.B.; IKEDA, T.I.; CRUZ, A.S. Testes in vitro de citotoxicidade: Estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v.6, n.3, p. 317-320, 2003.

ROLIM, T.L *et al.* Constituintes químicos e atividade antioxidante de *Byrsonima gardneriana* (Malpighiaceae). **Quím Nova**, v.36, n. 4. P. 524-527, 2013.

SAKATA, Rioko Kimiko; ISSY, Adriana Machado. **Fármacos para tratamento da dor**. Barueri, São Paulo: Editora Manole, 2008.

SANNOMIYA, M. *et al.*,. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extract. **J Ethnopharmacology**, v.97. 2005.

SANTOS, S DA C.; DE MELLO, J.C.P. Taninos. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro... (*et al.*,) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2007. p.1102.

SANTOS, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, Cláudia Maria Oliveira; GUERRA, Miguel Pedro... (*et al.*,) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2007. p.1102.

SILVA, E. M.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, Y.; **Food chemistry**, v.101, n.1012, 2007.

SILVA, M.S. *et al.*,.Plantas medicinais usadas nos distúrbios do trato gastrointestinal no povoado Colônia Treze, Lagarto, SE, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v.20. n.4, São Paulo. Out-dez, 2006.

SILVA, M.C.L. *et al.*, Compostos fenólicos, carotenoides e atividades antioxidantes em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**. Londrina, v.31, n.3, p. 669-682. 2010.

SILVA, N.L.A; MIRANDA, F.A.A; CONCEIÇÃO, G.M. Triagem fitoquímica de epífitas do cerrado, da área de proteção ambiental municipal de Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n.2, 2010.

SOUZA, J.N.S. *et al.* Antioxidant capacity of four polyphenol-rich amazonian plant extracts: A correlation study of chemical and biological in vitro assays. **Food Chemistry**, v.106. p. 331-339, 2008

SIEUWERTS, A. M. *et al.*, Tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for assessment of growth characteristics, IC50 values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem**, v. 33, p.813-823, 1995.

SOUTO, L.S; OLIVEIRA, D.M.T., Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Rev Brasil Bot**, v.28, n.4, p. 697-712, 2005.

TRACEY, K. The inflammatory reflex. **Nature**, v. 420, n.19, 2002.

TREVISAN, R.R. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades biológicas das cascas de *Celtis iguanaea* (Jacq.) Sargent ULMACEAE. Curitiba, 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná.

TUROLLA, M.S; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Rev Bras Ciên Farmac**, v.42, n.2, abril-jun. 2006.

VICENTINI, A., AND W. R. ANDERSON. 1999. Malpighiaceae. In **Flora da Reserva Ducke –Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**, edited by Ribeiro, J.E.L. da S., M.J.G. Hopkins, A. Vicentini, C.A. Sothers, M.A. da S. Costa, J.M. de Brito, M.A.D. de Souza, L.H.P. Martins, L.G. Lohmann, P.A.C.L. Assunção, C. Pereira, C.F. da Silva, M.R. Mesquita, and L.C. Proc. C.F. da Silva, M.R. Manaus: INPA-DFID.

VITOR, A. O. *et al.*, Psicofarmacologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Revista eletrônica de Comunicação Informação & Inovação em Saúde**, v.2 n.1, p.87-96. jan-jun, 2008.

VEIGA JR,C.; BOLZANI, V.S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quím Nova**, v.29, n.2, p. 326-337, 2006.

VIEIRA, L.J.S. Biodiversidade. Disponível em: www.planetamazonia.com.br/index.php?option=com...task. Acesso em 27 de janeiro de 2015.

WANG,Y. *et al.*, Exploration of the correlation between the structure, hemolytic activity, and cytotoxicity of steroids saponins. **Bioorg Med Chem**, v.15, p.2528-2532, 2007.

WINTER, C.A., RISLEY, E.A., NUSS, G.A. Carragenin induced edema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION, **Determination of Haemolytic activity, IN: Quality control methods for medicinal plants material**. Inglaterra, p. 41-43, 1998.

YEN G.C., DUH P. AND TSAI, H. Antioxidant and pro-oxidant properties of ascorbic acid and gallic acid. **Food Chem**, v.79. p. 307-313, 2002.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; FILHO, V.C. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova**. v.24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZUANAZZI, J.A.S; MONTANHA, J.A. Flavonóides. In: SIMÕES, C. M. O.; GUERRA, *et al.*, **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFRG, 2004. p.1102.

ANEXOS

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DAS ATIVIDADES DE ACESSO AO PATRIMÔNIO GENÉTICO REALIZADA DE ACORDO COM A RESOLUÇÃO CGEN Nº 35, DE 27 DE ABRIL DE 2011 Nº 03/2014

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN nº 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituição nacional, pública ou privada, que exerça atividade de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, **autoriza** com amparo na Resolução CGEN nº 35, de 27 de abril de 2011, que dispõe sobre regularização de atividades de acesso ao patrimônio genético e/ou ao conhecimento tradicional associado e sua exploração econômica realizadas em desacordo com a Medida Provisória no 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e demais normas, as **atividades de acesso ao patrimônio genético desenvolvidas pela:**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ, CNPJ/MF nº. 75.095.679/0001-49, situada na Rua XV de Novembro, 1299, Curitiba-PR, CEP: 80060-000, e representada na pessoa do Reitor Zaki Akei Sobrinho, RG nº. 1.439.536-9 SSP/PR, CPF nº. 359.063.759-53, no âmbito das atividades do projeto de pesquisa "*Estudo Químico e Biológico das Espécies Vegetais*".

Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

Período das atividades: 2000 a 2019.

Validade da Autorização: Cinco anos, contados da assinatura. Em razão da continuidade do projeto de pesquisa, a instituição detentora desta autorização deverá enviar ao Ibama, a partir da emissão da licença, **relatório anual** sobre a execução das atividades de pesquisa, nos termos do Decreto nº 4.946/2003 e Resolução CGEN nº 41/2013. Endereço para envio do relatório: IBAMA/DBFLO, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília-DF, CEP: 70818-900.

Esta autorização das atividades de acesso está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do processo nº 02001.001165/2013-47.

Brasília, 17 de março de 2014.

Volney Zanardi Junior
Presidente

ANEXO 2 – AUTORIZAÇÃO DE COLETA DE MATERIAL BOTÂNICO



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
 MINISTÉRIO DA CIÊNCIA E TECNOLOGIA - MCT
 INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA
 DIVISÃO DE SUPORTE ÀS ESTAÇÕES E RESERVAS - DSER

FORMULÁRIO DE AUTORIZAÇÃO

DADOS PESSOAIS	INFORMAÇÕES BÁSICAS
Nome: Fernanda Guilhon Simplicio	<input type="checkbox"/> Visita/Aula <input checked="" type="checkbox"/> Coleta/Pesquisa <input type="checkbox"/> Outros
Profissão/Cargo: Farmacêutica/Professora	Período: 13/11 a 28/11/2010
RG/CPF: 1677313-6/ 77981960215	Permanência: <input type="checkbox"/> Pernoite <input checked="" type="checkbox"/> Trânsito
Endereço: Av. Atroaris, Quadra 12, Casa 56, Cj. Renato Souza Pinto I, Cidade Nova I	Período das atividades: <input checked="" type="checkbox"/> Matutino <input checked="" type="checkbox"/> Vespertino <input type="checkbox"/> Noturno
Telefone (92) 99955454	Unidade de Conservação: Reserva Florestal Adolfo Ducke
ORIGEM	OBJETIVO
Instituição: Centro Universitário Nilton Lins	Coleta de material botânico para a realização de pesquisa científica.
Setor: Coordenação das Licenciaturas	
Projeto: Potencial farmacológico de espécies do gênero <i>Byrsonima</i> H. B. K. (Malpighiaceae) de ocorrência na cidade de Manaus (Amazonas).	
RELAÇÃO DE ACOMPANHANTES (ou em Anexo)	MATERIAL DA COLETA
André Luiz da Costa Carvalho	Folhas
	Cascas
	Material-testemunho (exsicata)
OBSERVAÇÕES	
Autorizado em: 12/11/2010	Fernanda Guilhon Simplicio
 Rubemildo Lima da Silva Chefe da DSER/INPA PO 254/2010	Solicitante
Autorização COAD/ DSER	 MCT/INPA Carlos Vitorino de Sá Pereira Pesquisador Titular III Coordenador CPPN/INPA PO 979/09
	Coordenador/ Chefe

SENHORES, QUEIRAM APRESENTAR ESTE FORMULÁRIO COM PELO MENOS 48 (QUARENTA E OITO) HORAS DE ANTECEDÊNCIA, PARA APRECIÇÃO DA CHEFIA DA DSER, OBEDECIDO AO EXPOSTO NO ART. 4º DA RESOLUÇÃO 06/2010.

Em conformidade com o Art. 3º, caput, da Resolução 06/2010, todos os visitantes que adentrarem nas reservas terão que assinar declaração individual eximindo o Inpa de qualquer responsabilidade por sinistros que possam ocorrer com os participantes durante a visita.

Em conformidade com o Art. 3º, II, da Resolução 06/2010, não será permitida a visitação de menores de 16 (dezesseis) anos, mesmo acompanhados dos responsáveis legais.

ANEXO 3 – DEPÓSITO DE EXSICATA



De: Michael Hopkins,

7 de fevereiro 2014

DEPOSITO DE MATERIAL TESTEMUNHA NO HERBÁRIO INPA

Declaro para os devidos fins que uma exciata do material coletado por Alberto Vicentini (número 857 na numeração dele, Registro número 179696 no INPA), e que a mesma foi identificada como *Byrsonima duckeana* por William R. Anderson em 1995. Duplicatas desta coleta foram distribuídas e depositadas nos herbários K, MG, MICH, RB e SP.

Segundo a anotação do coletor, a coleta foi feita de uma árvore na Reserva Florestal Adolpho Ducke plaqueaddeclaração de depósito com o número 2703, a mesma planta que foi alvo do estudo de Maria Christina Verdum.

Atenciosamente,

Dr. Michael J.G. Hopkins
Curador, herbário INPA.
Tecnologista em CTI, INPA

Michael J. G. Hopkins
Curador Herbário - INPA
P.O. 2702013



Ministério da
Ciência, Tecnologia
e Inovação



CBIO Coordenação de Biodiversidade, Av. André Araújo, 2936 - Petrópolis - CEP 69060-001 CX P.2223, CEP 69080-971 -
Fone (92) 3643-3129
MANAUS-AM, BRASIL <http://inpa.gov.br> e-mail mikehopkins4@hotmail.com

ANEXO 4 – PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – PUC- PR



Pontifícia Universidade Católica do Paraná
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética no Uso de Animais

Curitiba, 16 de fevereiro de 2012.

PARECER DE PROTOCOLO DE PESQUISA

REGISTRO DO PROJETO: 675 – 2ª versão

TÍTULO DO PROJETO: Atividade Antinociceptiva e anti-inflamatória de *Byrsonima duckeana*

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Patricia Maria Stuelp Campelo

EQUIPE DE PESQUISA:

Patricia Maria Stuelp Campelo, Isabelle Watanabe, Karina Lorena Meira Fernandes, Maria Fernanda Cordeiro

INSTITUIÇÃO:

Pontifícia Universidade Católica do Paraná

CENTRO / CURSO:

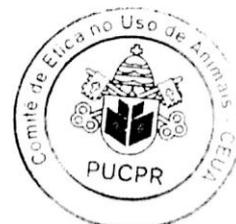
CCBS / Farmácia

ESPÉCIE DE ANIMAL	SEXO	IDADE / PESO	CATEGORIA	QUANTIDADE
Camundongos albinos suíços	Machos	60 dias / 25-30g	C	127

O colegiado do CEUA em reunião no dia 16/02/2012, avaliou o projeto e emite o seguinte parecer: **APROVADO**.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEUA-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEUA em qualquer tempo.



ANEXO 5 - PARECER DE COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL – UFAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM)



CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 048/2011- CEEA, sobre “Triagem farmacológica de *Byrsonima duckeana* W.R Anderson (*Malpighiaceae*) em modelos animais de dor inflamatória” sob responsabilidade de **FERNANDA GUILHON SIMPLICIO**, está de acordo com a legislação Federal pertinente ao uso científico de animais e foi **APROVADO** pelo COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA-UFAM) em reunião de 29/09/2011.

Manaus, 04 de outubro de 2011

Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEA-UFAM