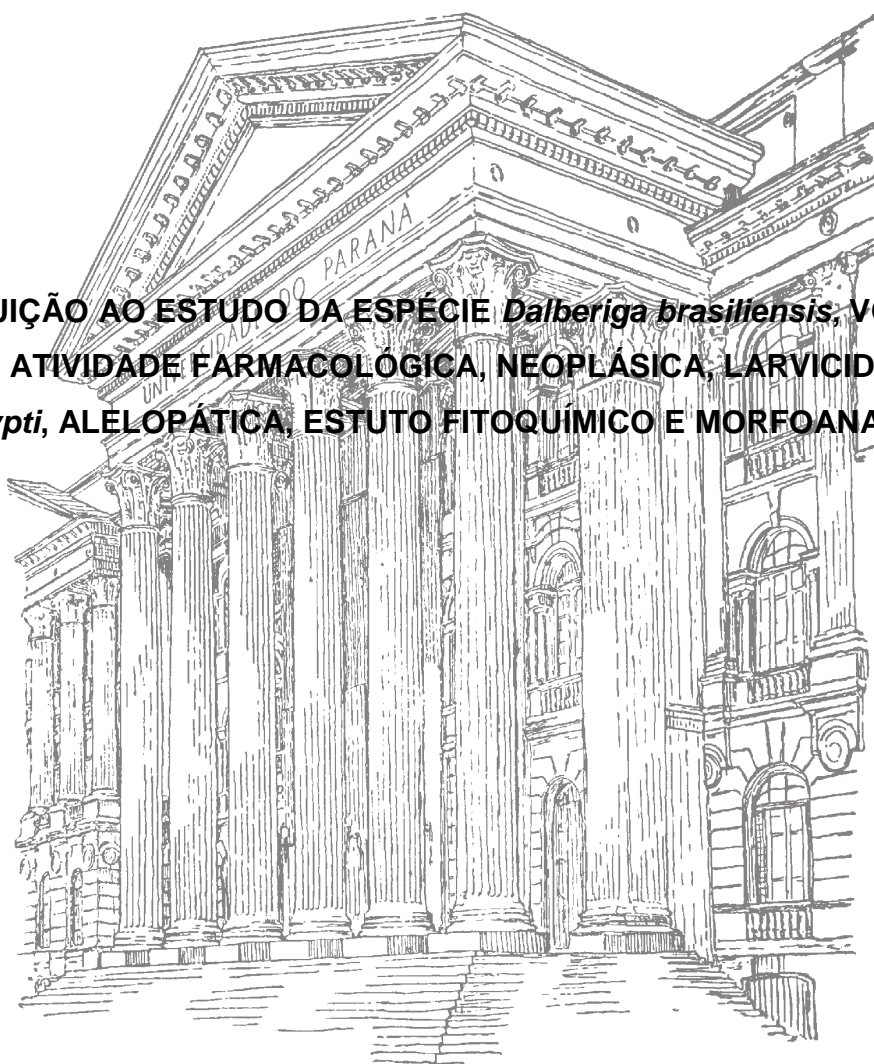


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LUCIANE DALARMI

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*, VOGUEL,
FABACEAE: ATIVIDADE FARMACOLÓGICA, NEOPLÁSICA, LARVICIDA SOBRE
Aedes aegypti, ALELOPÁTICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOANATÔMICO**



CURITIBA

2017

LUCIANE DALARMI

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*, VOGUEL,
FABACEAE: ATIVIDADE FARMACOLÓGICA, NEOPLÁSICA, LARVICIDA SOBRE
Aedes aegypti, ALELOPÁTICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOANATÔMICO**

Tese apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Doutora em Ciências Farmacêuticas, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof^a Dr^a Marilis Dallarmi Miguel
Coorientadoras: Prof^a Dr^a Sandra Maria Warumby Zanin
Prof^a Dr^a Cristiane Bezerra da Silva

CURITIBA

2017

Dalarni, Luciane

Contribuição ao estudo da espécie *Dalbergia brasiliensis*, Voguel, Fabaceae: atividade farmacológica, neoplásica, larvicida sobre *Aedes aegypti*, alelopática, estudo fitoquímico e morfoanatômico / Luciane Dalarni – Curitiba, 2017.
155 f. ; il. (algumas color.) ; 30 cm

Orientadora: Professora Dra. Marilis Dallarni Miguel

Coorientadora: Professora Dra. Sandra Maria Warumby Zanin

Coorientadora: Professora Dra. Cristiane Bezerra da Silva

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

Inclui bibliografia

1. *Dalbergia*. 2. *Fabaceae*. 3. *Aedes aegypti*. I. Miguel, Marilis Dallarni. II. Zanin, Sandra Maria Warumbi. III. Silva, Cristiane Bezerra da. IV. Universidade Federal do Paraná.
V. Título.

CDD 615.321



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
Setor CIÊNCIAS DA SAÚDE
Programa de Pós-Graduação CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÉUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da tese de Doutorado de **LUCIANE DALARMI** intitulada: **CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*, VOGUEL, FABACEAE: ATIVIDADE FARMACOLÓGICA, ANTINEOPLÁSICA, LARVICIDA SOBRE *Aedes aegypti*, ALELOPÁTICA, ESTUDO FITOQUÍMICO E MORFOANATÔMICO**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de doutor está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 19 de Julho de 2017.



MARILIS DALLARMI MIGUEL

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



VINICIUS BEDNARCZUK DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UNIANDRADE)



JOSIANE DE FÁTIMA GASPARI DIAS

Avaliador Externo (UFPR)



DEISE PREHS MONTRUCCHIO

Avaliador Externo (UFPR)



BEATRIZ CRISTINA KONOPATZKI HIROTA

Avaliador Externo (UFPR)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, por todas as oportunidades, pelas pessoas e desafios colocados em meu caminho, e a minha família, que sempre me deu apoio e cuidou das minhas filhas quando estive ausente.

À Universidade Federal do Paraná e ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À professora Dra Marilis Dallarmi Miguel pela orientação, incentivo, amizade desde o mestrado.

À professora Dra Sandra Maria Warumby Zanin pela orientação, incentivo e apoio nos momentos difíceis.

À amiga Dra Cristiane Bezerra da Silva por sempre estar ao meu lado, contribuindo para a realização do trabalho.

À professora Dra Deise Prehs Montrucchio por toda a ajuda na farmacologia e amizade.

Ao professor Obdulio Gomes Miguel pelos ensinamentos em fitoquímica e pela orientação desde o mestrado.

Ao Sr. Pedro Zanin pelo isolamento e identificação de substâncias e pela amizade.

À amiga Fernanda Maria Marins Ocampos pela identificação de substâncias, e à Daniela Maria Soares de Oliveira, Ana Flávia Schvabe e Mariana Saragiotto Krause pelo apoio e amizade.

Aos professores Drs Euclésio Simionatto e Maria de Fátima C. Matos pelo suporte na realização de estudos de atividades biológicas.

À professora Luisa Mota da Silva pela colaboração nos experimentos da gastroproteção.

Aos professores Drs Josiane de Fatima Gaspari Dias, Vitor Alberto Kerber, Vinicius Bednarczuk de Oliveira, Cristiane da Silva Paula, Beatriz Cristina Konopatzki Hirota pelas conversas e ensinamentos.

Aos colegas Maislian de Oliveira, Ellis Marina Szabo, Camila de Jesus, Lígia Burci, Francis Zortea Merino e Paulo Diniz que de formas diferentes contribuíram para realização do trabalho.

À Capes, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

A espécie *Dalbergia brasiliensis*, conhecida popularmente como Jacarandá, é uma árvore endêmica do cerrado e da Floresta Atlântica do Brasil. O presente estudo tem como objetivo gerar informações que contribuam para conhecimento e controle de qualidade da espécie. O material, coletado na cidade de Curitiba-PR-Brasil, foi utilizado para obtenção do extrato etanólico bruto e, posteriormente, para as frações hexano, clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas. De acordo com o estudo anatômico, a folha da *D. brasiliensis* é composta, imparipinada, hipostomática com estômatos paracíticos. O mesofilo é dorsiventral. O pecíolo, semelhante ao feixe da lâmina foliar, possui anel colenquimático que circunda o floema e xilema. Observa-se a presença de tricomas tectores na folha e pecíolo. No caule, presença de tricomas tectores, estrelados e glandulares. O floema, contendo vários idioblastos, é externo ao xilema o qual é totalmente lignificado. Com relação a composição química, utilizando experimentos de RMN de ^1H , HSQC e HMBC, identificou-se a isoflavona gliciteína (4',7-dihidroxi-6-metoxisoflavona) da fração cloroformica da folha, o flavonoide hiperoside (quercetina-3-O- β -galactosideo) da fração acetato de etila da folha e a flavonona aromadendrin-6-C-glucosideo e o flavonoide kampferol-6-C-glucosideo da fração acetato de etila da casca, que foram identificados pela primeira vez no gênero e na família. Em relação à atividade alelopática, verificou-se que a espécie demonstrou potencial fitotóxico ao influenciar a germinação e o crescimento da *L. sativa* e *A. cepa*. Para a avaliação larvicida sobre o mosquito *Aedes aegypti*, utilizou-se uma mistura de compostos isolados em estudo anterior da espécie, a afrormosina e fujikinetina, onde não apresentaram atividade contra a larva. Estes mesmos compostos, como também os extratos e frações da espécie, não demonstrou atividade antimicrobiana frente às cepas das bactérias e fungos testados. No entanto, a afrormosina e fujikinetina, apresentaram forte citotoxicidade frente a todas as linhagens de células neoplásicas testadas. As frações clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas também demonstraram citotoxicidade frente a estas células. Na avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, os resultados significativos do extrato bruto das folhas nos experimentos edema de pata e nocicepção induzida por formalina, sugere um potencial anti-inflamatório por meio da possível interferência de mediadores que contribuem na inflamação, como a inibição da cicloxigenase e conseqüentemente das prostaglandinas. Na atividade gastroprotetora, o extrato bruto da casca apresentou significativa redução das lesões gástricas induzidas por etanol e a mistura afrormosina e fujikinetina demonstrou, além da redução das lesões, redução da atividade da MPA e dos níveis de LOOH, não elevou os níveis de GSH e aumentou a produção de muco aderido à mucosa gástrica. O provável mecanismo de ação combina um efeito protetor da mucosa gástrica, com um efeito antioxidante e inibição de migração de neutrófilos favorecendo uma cicatrização gástrica. No estudo de toxicidade crônica, o extrato bruto das folhas não alterou indicadores toxicológicos. Desta forma, a *D. brasiliensis* constitui-se como uma potencial candidata para a continuidade de estudos mais aprofundados, pré clínicos e clínicos, visando o desenvolvimento de fármacos fitoterápicos.

Palavras-chaves: *Dalbergia brasiliensis*, afrormosina, fujikinetina, citotoxicidade, efeito anti-inflamatório, efeito gastroprotetor

ABSTRACT

The species *Dalbergia brasiliensis*, popularly known as Jacarandá, is an endemic tree of the cerrado and the Atlantic Forest of Brazil. The present study aims to generate information that contributes to knowledge and quality control of the species. The material, collected in the city of Curitiba-PR-Brazil, was used to obtain the crude ethanolic extract, and, later, the hexane, chloroform and ethyl acetate fractions from leaves and bark. According to the anatomical study, the leaves of *D. brasiliensis* is composed, imparipinada, hypostomatic with paracytic stomata. The mesophyll is dorsiventral. The petiole, similar to the bundle of the leaf blade, has a colenquimático ring that surrounds the phloem and xylem. Presence of tectonic trichomes on leaf and petiole. In the stem, it is observed the presence of tectric trichomes, starry and glandular. The phloem, containing several idioblasts, is external to the xylem which is fully lignified. With respect to the chemical composition, using NMR ¹H, HSQC and HMBC experiments, the isoflavone glycyteine (4', 7-dihydroxy-6-methoxysoflavone) was identified from the chloroform fraction of the leaf, the flavonol hyperoside (quercetin-3-O-β-galactoside) of the ethyl acetate fraction of the leaf and the flavonoids aromadendrin-6-C-glucoside and kampferol-6-C-glucoside of the ethyl acetate fraction of the bark that were first identified in the genus. In relation to the allelopathic activity, it was verified that the species demonstrated phytotoxic potential by influencing the germination and growth of *L. sativa* and *A. cepa*. For the larvicidal evaluation of the *Aedes aegypti*, a compound isolated from *D. brasiliensis* in a previous study, afrormosin and fujikineticin, was used and it did not present activity against the larva. This same compound, as well as the extracts and fractions of the species, did not have antimicrobial activity against the strains of bacteria and fungi tested in the study. However, afrormosin and fujikineticin showed strong cytotoxicity against all neoplastic cell lines tested. The chloroform and ethyl acetate fractions of leaves and bark also showed cytotoxicity to these cells. In the antinociceptive and anti-inflammatory evaluation, the significant results of the crude leaf extract in the paw edema and nociception induced by formalin experiments suggest an anti-inflammatory potential through the interference of mediators that contribute to inflammation, such as inhibition of cyclooxygenase and hence prostaglandins. In the gastroprotective activity, the crude bark extract showed a significant reduction of the gastric lesions induced by ethanol and the compound afrormosin and fujikineticin demonstrated, in addition to the reduction of the lesions, a reduction of the activity of the MPA and the levels of LOOH, did not raise the levels of GSH and increased the production of mucus adhered to the gastric mucosa. The likely mechanism of action combines a protective effect of the gastric mucosa with an antioxidant effect and inhibition of neutrophil migration favoring gastric healing. In the chronic toxicity study, the crude leaf extract did not change toxicological indicators. Thus, *D. brasiliensis* constitutes a potential candidate for the continuation of further studies, aiming the development of phytotherapeutic drugs.

Key-words: *Dalbergia brasiliensis*, afrormosin, fujikineticin, cytotoxicity, anti-inflammatory effect, gastroprotective effect.

LISTA DE FIGURA

FIGURA 1 - IMAGENS DA ÁRVORE, TRONCO, FLOR E FOLHAS DE <i>D. brasiliensis</i>	35
FIGURA 2 - OCORRÊNCIA <i>D. brasiliensis</i> NO BRASIL	37
FIGURA 3 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO HEXANO DA CASCA DA <i>D. brasiliensis</i>	39
FIGURA 4 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ISOFLAVONOIDES AFRORMOSINA E FUJIKINETINA DA FRAÇÃO CLOROFORMIO DA CASCA DA <i>D. brasiliensis</i>	39
FIGURA 5 - ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN ¹ H DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA MOSTRANDO SINAIS MAIS INTENSOS PARA AFRORMOSINA.....	40
FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA COM A ESPÉCIE <i>Dalbergia brasiliensis</i>	43
FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE CAMUNDONGO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA.....	60
FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE CAMUNDONGO SOB EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO: CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA ABDOMINAL COM ALONGAMENTO DE MEMBROS INFERIORES.....	60
FIGURA 9 - MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA.....	61
FIGURA 10 - TESTE DO CAMPO ABERTO	63
FIGURA 11 - TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA	63
FIGURA 12 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA <i>D. brasiliensis</i>	67
FIGURA 13 - MORFOANATOMIA FOLHA <i>D. brasiliensis</i>	68
FIGURA 14 - MORFOANATOMIA FOLHA <i>D. brasiliensis</i>	70
FIGURA 15 - MORFOANATOMIA PECÍOLO <i>D. brasiliensis</i>	71
FIGURA 16 - MORFOANATOMIA CAULE <i>D. brasiliensis</i>	73

FIGURA 17 - TESTES HISTOQUÍMICOS DA FOLHA DA <i>D. brasiliensis</i>	74
FIGURA 18 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO PECÍOLO DA <i>D. brasiliensis</i>	75
FIGURA 19 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO CAULE DA <i>D. brasiliensis</i>	76
FIGURA 20 - ASPECTOS DA FOLHA DE <i>D. brasiliensis</i> OBTIDAS PELA TÉCNICA DE MICROTOMOGRÁFIA	79
FIGURA 21 - ASPECTOS DO CAULE DE <i>D. brasiliensis</i> OBTIDAS PELA TÉCNICA DE MICROTOMOGRÁFIA	80
FIGURA 22 - EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,00 A 6,80 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA GLICITEINA.....	81
FIGURA 23 - ESTRUTURA QUÍMICA DA ISOFLAVONA GLICITEINA.....	82
FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA GLICITEINA	82
FIGURA 25 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DA GLICETEÍNA	83
FIGURA 26 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DA GLICETEÍNA.....	83
FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE.....	86
FIGURA 28 - EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,00 A 6,00 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE	86
FIGURA 29 - EXPANSÃO DA REGIÃO DO AÇUCAR NO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE	87
FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONOIDE HIPEROSIDE	88
FIGURA 31 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DO HIPEROSIDE	89
FIGURA 32 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DO HIPEROSIDE.....	89
FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E O KAEMPFEROL-6-C-GLUCOSÍDEO	91

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN ^1H DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSIDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSIDEO	92
FIGURA 35 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DA AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSIDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSIDEO	93
FIGURA 36 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTANCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSIDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSIDEO	93
FIGURA 37 - CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA ALFACE E DA CEBOLA EM PRESENÇA DO EXTRATO E FRAÇÕES DA <i>D. brasiliensis</i>	99
FIGURA 38 - CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO/COLEÓPTILO DA ALFACE E DA CEBOLA EM PRESENÇA DO EXTRATO E FRAÇÕES DA <i>D. brasiliensis</i>	100
FIGURA 39 - EFEITO DO EB DAS FOLHAS DA <i>D. brasiliensis</i> SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL	107
FIGURA 40 - EFEITO DO EB DAS CASCA DA <i>D. brasiliensis</i> SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL	108
FIGURA 41 - EFEITO DO EB DAS CASCA DA <i>D. brasiliensis</i> (10mg/kg) SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA	109
FIGURA 42 - EFEITO DOS ISOLADOS DA CASCA DE <i>D. brasiliensis</i> EM ÚLCERAS INDUZIDAS POR ETANOL	110
FIGURA 43 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA QUANTIFICAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO NAS LESÕES POR ETANOL.....	111
FIGURA 44 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DA MPO EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL.....	111
FIGURA 45 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DE GSH EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL	112
FIGURA 46 - EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DE LOOH EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL.....	113

FIGURA 47 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> (DOSES BAIXAS) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	118
FIGURA 48 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> (DOSES ALTAS) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA	119
FIGURA 49 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	120
FIGURA 50 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	121
FIGURA 51 - PESO DIÁRIO DURANTE OS 21 DIAS DE ADMINISTRAÇÃO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i>	125
FIGURA 52 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NO PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS VITAIS.....	126
FIGURA 53 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NAS DOSAGENS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	127
FIGURA 54 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NAS DOSAGENS DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS.....	128
FIGURA 55 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NO TESTE DO CAMPO ABERTO	130
FIGURA 56 - EFEITO DO EB DA <i>D. brasiliensis</i> NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA	130

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>D. brasiliensis</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>L. sativa</i>	96
QUADRO 2 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE <i>D. brasiliensis</i> SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE <i>A. cepa</i>	97
QUADRO 3 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS NA TOXICIDADE CRÔNICA	129

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO <i>Dalbergia</i>	25
TABELA 2 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA <i>D. brasiliensis</i>	34
TABELA 3 - CRESCIMENTO DA <i>D. brasiliensis</i> EM EXPERIMENTOS, NO PARANÁ E EM MINAS GERAIS.....	36
TABELA 4 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DAS FOLHAS E CASCAS DA <i>D. brasiliensis</i>	37
TABELA 5 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA <i>D. brasiliensis</i>	38
TABELA 6 - RESULTADO DO ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA <i>D. brasiliensis</i>	38
TABELA 7 - RESULTADOS DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS FRAÇÕES DA <i>D. brasiliensis</i>	41
TABELA 8 - DESLOCAMENTO QUÍMICO DA GLICITEINA	84
TABELA 9 - DESLOCAMENTO QUÍMICO DO HIPEROSIDE	90
TABELA 10 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E KAMPFEROL -6-C-GLUCOSÍDEO	94
TABELA 11 - CL ₅₀ E CL ₉₀ DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA CONTRA LARVAS DE <i>Aedes aegypti</i>	103
TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS AMOSTRAS da <i>D. brasiliensis</i>	104
TABELA 13 - RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DAS AMOSTRAS DE <i>D. brasiliensis</i>	106

LISTA DE SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
ACT	Ácido tricloroacético
ALT	Alamina aminotransferase
AINE	Anti-inflamatório não esteroide
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butilhidroxitolueno
CD ₃ OD	Metanol deuterado
CIM	Concentração inibitória mínima
COX	Cicloxygenase
CDCl ₃	Cloroformio deuterado
CEUA	Comitê de ética para uso de animais
°C	Grau Celsius
Csb	Câmera subestomática
CBX	Carbenoxolona
Col	Colênquima
CI ₅₀	Concentração inibitória média
DI ₅₀	Dose inibitória média
DL ₅₀	Dose letal média
DAP	Diâmetro à altura do peito
<i>D</i>	Dubleto
<i>Dd</i>	Duplo dubleto
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTNB	Ditiobis 2-ácido nitrobenzoico
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2 difenil-1-1-picril-hidrazil
EB	Extrato etanólico bruto
Ep	Epiderme
Es	Estômato
Fb	Fibras
FAE	Fração acetato de etila
FC	Fração clorofórmio

FH	Fração hexano
FI	Floema
GSH	Grupos sulfídricos não proteicos
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSCQ	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
Hz	Hertz
IA	Índice antioxidante
IL- β	Interleukin beta
Id	Idioblastos
i.p.	Intra peritoneal
IVG	Índice de velocidade de germinação
<i>J</i>	Constante de acoplamento
LOOH	Hidroperóxido lipídico
M	Mol por litro
M	Multiplete
MEV	Microscópio eletrônico de varredura
MPO	Mieloperoxidase
Nm	Nanometro
Ph	Potencial hidrogeniônico
PPM	Partes por milhão
Pq	Parênquima
Pqp	Parênquima paliçádico
Pql	Parênquima lacunoso
RMN ^1H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SDS	Dodecil sulfato de sódio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TNF- α	Fator necrose tumoral
Tc	Tricoma
Tct	Tricoma tector
Tcg	Tricoma glandular
TMB	Tetrametilbenzidina
Vei	Veículo
v.o.	Via oral
XI	Xilema

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
1.1	OBJETIVOS	22
1.1.1	Objetivo Geral	22
1.1.2	Objetivos específicos.....	22
2	REVISÃO DA LITERATURA	23
2.1	FAMÍLIA FABACEAE	23
2.2	CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO <i>Dalbergia</i>	24
2.2.1	Atividades Biológicas do Gênero <i>Dalbergia</i>	26
2.2.1.1	Atividades anti-inflamatória	26
2.2.1.2	Atividade estimuladora da contração da musculatura uterina	27
2.2.1.3	Atividade antiprotozoário	27
2.2.1.4	Atividade citotóxica e preventiva do câncer.....	27
2.2.1.5	Atividade angiogênica	28
2.2.1.6	Atividade antidiarréica	28
2.2.1.7	Atividade diurética	29
2.2.1.8	Atividade antitrombótica e antiplaquetária.....	29
2.2.1.9	Atividade antiulcerogênica.....	29
2.2.1.10	Atividade espermatogênica	30
2.2.1.11	Atividade osteogênica	30
2.2.1.12	Atividade fotoprotetora	31
2.2.1.13	Atividade antimicrobiana	31
2.2.1.14	Atividade antioxidante	33
2.2.1.15	Atividade larvicida.....	33
2.3	CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE <i>Dalbergia brasiliensis</i> , Vogel.....	34
2.3.1	Sinonímia vulgar.....	34
2.3.2	Descrição Botânica.....	34
2.3.3	Ocorrência da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	37
2.3.4	Dados fitoquímicos da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	37
2.3.4.1	Obtenção dos extratos brutos e frações da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	37
2.3.4.2	Ensaio sistemático de análise fitoquímica da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	38
2.3.4.3	Compostos identificados da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	39

2.3.5	Atividade Antioxidante da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	41
2.3.6	Ensaio preliminares de toxicidade da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	42
2.3.7	Atividade Larvicida da <i>Dalbergia brasiliensis</i>	42
3	MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1	OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	44
3.2	ESTUDO MORFOANATÔMICO	44
3.2.1	Lâminas semipermanentes	45
3.2.2	Testes microquímicos.....	45
3.2.3	Microscopia Eletrônica de Varredura.....	46
3.2.4	Microtomografia computadorizada	46
3.3	PURIFICAÇÕES DAS FRAÇÕES E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL.....	47
3.3.1	Fração clorofórmio da folha	48
3.3.2	Fração acetato de etila da folha	48
3.3.3	Fração acetato de etila da casca.....	49
3.4	ATIVIDADE ALELOPÁTICA	50
3.4.1	Preparo do Teste.....	50
3.4.2	Teste de Germinação	50
3.4.3	Teste de Crescimento	50
3.5	ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	51
3.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	52
3.7	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	53
3.8	ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	54
3.8.1	Avaliação da Atividade Gastroprotetora	55
3.8.1.1	Lesão gástrica aguda induzida por etanol	55
3.8.1.2	Lesões gástricas induzidas por indometacina	56
3.8.1.3	Avaliação de mecanismo envolvido na ação cicatrizante gástrica	56
3.8.1.3.1	Quantificação do muco gástrico	56
3.8.1.3.2	Quantificação de grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)	57
3.8.1.3.3	Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO).....	58
3.8.1.3.4	Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)	58
3.8.2	Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória	59
3.8.2.1	Nocicepção induzida por formalina	59
3.8.2.2	Nocicepção induzida por ácido acético	60

3.8.2.3	Avaliação do edema da pata induzido pela carragenina	61
3.8.3	Toxicidade Crônica.....	61
3.8.3.1	Avaliação da atividade locomotora.....	62
3.8.3.2	Teste da natação forçada.....	63
3.8.3.3	Análises Histológicas.....	64
3.8.4	Análise Estatística das Atividades Farmacológicas.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÕES	66
4.1	ESTUDO MORFOANATÔMICO.....	66
4.1.1	Análise Morfológica Externa.....	66
4.1.2	Análise Anatômica.....	66
4.1.3	Microtomografia.....	78
4.2	IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS.....	81
4.2.1	Fração clorofórmio da folha.....	81
4.2.2	Fração acetato de etila da folha	85
4.2.3	Fração acetato de etila da casca.....	91
4.3	ATIVIDADE ALELOPÁTICA	95
4.3.1	Teste de Germinação	95
4.3.2	Teste de Crescimento	98
4.4	ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O MOSQUITO <i>Aedes aegypti</i>	102
4.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	103
4.6	ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS.....	105
4.7	AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA.....	106
4.7.1	Avaliação do extrato bruto em lesão gástrica induzida por etanol.....	107
4.7.2	Avaliação do extrato bruto em lesão gástrica induzida indometacina ...	108
4.7.3	Avaliação dos isolados da casca na lesão gástrica induzida por etanol	109
4.7.4	Quantificação do muco gástrico	110
4.7.5	Determinação da mieloperoxidase (MPO).....	111
4.7.6	Efeito dos isolados nos indicadores do estresse oxidativo.....	112
4.7.6.1	Quantificação dos grupos sulfídricos não proteicos (GSH)	112
4.7.6.2	Determinação dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH).....	113
4.7.7	Discussão da atividade gastroprotetora	113
4.8	AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA.....	117
4.8.1	Nocicepção induzida por formalina.....	118

4.8.2	Nocicepção induzida por ácido acético	119
4.8.3	Edema de pata induzido por carragenina.....	120
4.8.4	Discussão da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva.....	121
4.9	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS	124
4.9.1	Peso do animal.....	124
4.9.2	Peso dos órgãos vitais	125
4.9.3	Avaliação de parâmetros bioquímicos.....	126
4.9.4	Avaliação de parâmetros hematológicos.....	127
4.9.5	Análises histopatológicas	128
4.9.6	Teste do Campo Aberto	129
4.9.7	Teste da Natação forçada	130
4.9.8	Discussão da avaliação de toxicidade crônica	131
5	CONCLUSÃO	135
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	137
	REFERÊNCIAS	138
	ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO IBAMA	156
	ANEXO 2 – CERTIFICADO CEUA	157

1 INTRODUÇÃO

A pesquisa de espécies vegetais possibilita a identificação de metabólitos secundários valiosos que podem servir como fármacos ou conduzir ao desenvolvimento de novas substâncias terapêuticas. (GOBBO-NETO & LOPES, 2007).

Através de estudos realizados na área de plantas medicinais, um grande número de plantas se provou útil no tratamento de enfermidades e os avanços recentes nas áreas médicas e biológicas trouxeram novas tecnologias para aprofundar o conhecimento sobre a importância biológica de fitoterápicos e seu uso clínico, permitindo entender os mecanismos de ação desses medicamentos para o desenvolvimento de terapias eficazes. (LUQMANN et al., 2014).

O desenvolvimento de novos fármacos anti-inflamatórios e analgésicos tem sido importante objeto de estudo por muitos grupos de pesquisa e as plantas medicinais surgem como uma fonte promissora de compostos com atividade farmacológica. Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação a sua potência, eficácia e efeitos adversos. (PARENTE, 2001). Os AINEs (anti-inflamatórios não esteroidais) apresentam efeitos adversos gastrointestinais e os AINEs seletivos para a COX-2 foram associados a alterações cardiovasculares pequenas, porém proeminentes em alguns pacientes. (PARENTE, 2001; BOERS, 2001). Os anti-inflamatórios esteroidais possuem relevantes efeitos adversos devido ação comum dos esteroides. Já os moduladores ou anti-citocinas (anti-IL-1 β e anti-TNF- α) apresentam custo elevado e a via de administração é subcutânea, o que diminuiu a adesão ao tratamento. (CALIXTO et al., 2004). Devido a esses inconvenientes torna-se necessário a busca de substâncias naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos com baixo custo e com efeitos adversos reduzidos.

A busca por novos fármacos com atividade antiúlcera também é necessária. Dados epidemiológicos estimam que em algum momento da vida, entre 4 a 12% da população adulta desenvolva um quadro de úlcera gástrica e que o risco atribuído para o desenvolvimento de uma infecção por *Helicobacter pylori* é de 48%. (LEONTIADAS & NYREN, 2014). Os produtos de origem vegetal possuem atividade antiúlcera por meio de efeitos profilático (gastroprotetor), terapêutico (cicatrizante) e

a combinação de ambos. Os profiláticos possuem efeito principalmente através de atividade antioxidante e anti-inflamatória, enquanto que os terapêuticos possuem atividade antissecretora (de ácido) ou cicatrizantes. (AWAAD, et al., 2013).

Houghton et al. (2007) afirmam que, das descobertas de drogas nos últimos quarenta anos, uma parte significativa tem sido focada em agentes para a prevenção e o tratamento de câncer, já que o câncer está entre as três causas mais comuns de morte e morbidade na maioria dos países desenvolvidos e, cada vez mais nos países em desenvolvimento. Estudos nessa área aumentaram de forma considerável visto que ainda existe uma lacuna no conhecimento da biogênese de tumores e mecanismo de ação para o controle ou erradicação dos mesmos. (FERREIRA, 2006).

Neste contexto, buscam-se nas plantas medicinais terapias alternativas para tratamento de muitas enfermidades. Através dos metabólitos secundários presentes na biodiversidade da flora brasileira e utilizando o conhecimento popular de séculos acerca do uso de plantas medicinais, espera-se obter novos medicamentos que ofereçam melhor eficácia e menos efeitos adversos.

O interesse por substâncias químicas obtidas de plantas também é enfoque na pesquisa de novos agentes herbicidas, atentando-se principalmente ao controle da contaminação ambiental e à redução do risco de resíduos em alimentos. No campo da alelopatia concentram-se os estudos relacionados à avaliação da influência positiva ou negativa de substâncias produzidas por plantas (agentes alelopáticos) sobre outros sistemas biológicos. Os ensaios laboratoriais constituem o primeiro passo para a identificação de promissores produtos para a área da agricultura ecológica. (DIAS et al., 2005).

O gênero *Dalbergia*, família Fabaceae, compreende de árvores de pequeno a médio porte, arbustos e lianas, apresentando larga distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. Muitas espécies do gênero são utilizadas na medicina tradicional chinesa (CARVALHO, 2004) e possuem reconhecidas propriedades biológicas como analgésicas, anti-inflamatória, antihelmíntica, antioxidante, antimicrobiana, antiulcerogênica, antitumoral, larvicida, entre outras. (SAHA et al., 2013; DALARMI et al., 2015).

Muitos trabalhos científicos realizados com espécies da família *Dalbergia* apresentam o isolamento de uma variedade de metabólitos secundários, com

destaque aos flavonoides, alocados como marcadores quimiotaxonômicos de muitas espécies e que possuem grande importância para a medicina, no tratamento e prevenção de doenças. (VASUDEVA et al., 2009; SAHA et al., 2013).

A espécie *Dalbergia brasiliensis* conhecida popularmente como Jacarandá, caroaba-brava, caviúna ou marmeleiro, ocorre de forma natural no Cerrado e Floresta Atlântica do Brasil. (Carvalho, 2004). A escassez de estudos sobre *D. brasiliensis* aliada às conhecidas potencialidades biológicas e farmacológicas do gênero, objetivou este estudo, por meio da investigação da atividade antinociceptiva, gastroprotetora, antineoplásica e alelopática, além do estudo fitoquímico e morfoanatômico, das folhas e caule da espécie.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Contribuir com o estudo da espécie *Dalbergia brasiliensis*, Voguel, por meio do estudo fitoquímico e morfoanatômico e da investigação das atividades farmacológicas e biológicas.

1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar a caracterização morfoanatômica da folha e do caule da *D. brasiliensis*;
- Isolar e identificar as substâncias químicas das frações de diferentes polaridades (hexano, clorofórmio e acetato de etila) obtidas do extrato etanólico bruto das folhas e do caule da *D. brasiliensis*;
- Avaliar as atividades biológicas: antimicrobiana, antineoplásica e alelopática dos extratos etanólicos brutos e frações da *D. brasiliensis*;
- Avaliar a atividade contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti* da mistura dos isoflavonoides afrormosina e fujikinetina, isolados da fração clorofórmio do caule da *D. brasiliensis*;
- Avaliar a atividade gastroprotetora do extrato bruto etanólico do caule, folhas e isolados da *D. brasiliensis*;
- Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto etanólico das folhas da *D. brasiliensis*;
- Avaliar a toxicidade crônica do extrato bruto etanólico das folhas da *D. brasiliensis*

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 FAMÍLIA FABACEAE

A família Fabaceae (Leguminosae), dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, consiste de 440 gêneros e 12 mil espécies. O maior gênero, *Austragalus*, possui em torno de 2 mil espécies, sendo que vários gêneros possuem importante representatividade. São plantas de hábito muito variado, desde grandes árvores a arbustos, subarbustos, ervas anual ou perene e também trepadeiras, vivem em diferentes altitudes e latitudes. Encontram-se dispersas nas regiões temperadas, frias e também tropicais. (CRONQUIST, 1981).

Joly (1998) afirma que a família das leguminosas compreende mais de 600 gêneros que reúnem mais de 13 mil espécies (uma das maiores dentre as dicotiledôneas). A família das leguminosas encontra-se dispersa por todo o mundo, especialmente nas regiões tropicais e subtropicais.

Seu valor econômico é significativo e junto com as gramíneas representam as mais importantes famílias produtoras de alimentos vegetais. A parte disto, a família Fabaceae produz valiosas drogas medicinais, espécies ornamentais, forrageiras, produtoras de azeites e inseticidas, fixadoras de nitrogênio e muitas outras funções. (SALINAS, 1992).

As folhas são sempre de disposição alterna, compostas, pari ou imparipenadas, com estípulas ou estipelas às vezes transformadas em espinhos. As folhas podem se apresentar modificadas em gavinhas ou estar reduzidas a dois ou um só folíolo. Folhas e folíolos de todas as ordens sempre com pulvinos (articulações) na base, nos pecíolos ou nos peciólulos, que permitem movimentos em resposta a variados agentes. (JOLY, 1998). Possuem estômatos de diversos tipos. (CRONQUIST, 1981).

As flores são sempre cíclicas, de simetria radial, zigomorfas, diclamídeas com cálice gamossépalo, pentâmero ou tetrâmero; corola dialipétala pentâmera ou tetrâmera na maioria das vezes com pétalas muito desiguais. Androceu formado por quatro até dez estames, livres ou soldados entre si. Ovário sempre súpero, unicarpelar e unilocular, às vezes divididos por falsos septos, com muitos óvulos. Os

frutos são variados, em geral, apresentam-se como legume, seco, deiscente por duas valvas, do tipo lomento segmentando-se, seco e indeiscente ou ainda de pericarpo mais ou menos carnoso. As sementes, frequentemente, estão envoltas em mucilagens ou polpa doce, ou com arilo ou testa duríssima. (JOLY, 1998).

O caule freqüentemente é provido com vários tipos de pêlos. Apresentam comumente cristais solitários de oxalato de cálcio em algumas células da epiderme ou parênquima. São frequentes a presença dispersa de células secretoras de tanino, gomas e outras substâncias como protoantocianinas, ácido cianogênico, mas não o ácido elágico, comumente produzem alcaloides especialmente dos grupos da piridina, quinolizidina e indol. (CRONQUIST, 1981).

2.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE O GÊNERO *Dalbergia*

O gênero *Dalbergia* pertence à família Fabaceae, embora também existam correntes que a classifiquem como subfamília Papilionoideae (Faboideae) da família Leguminosae. (DI STASI et al., 2002). As espécies deste gênero caracterizam-se como árvores, arbustos e trepadeiras lenhosas amplamente distribuídas em regiões tropicais e subtropicais. O gênero consiste de 300 espécies sendo aproximadamente 39 destas de ocorrência no Brasil. (CARVALHO, 1997; VASUDEVA et al., 2009).

Muitas espécies do gênero *Dalbergia* possuem sua madeira valorizada por ser decorativa e perfumada, rica muitas vezes em óleos essenciais. Possuem ampla aplicação tradicional, sendo utilizada na medicina popular como analgésicos, anti-inflamatórios, antimicrobianos, antidiarreicos, antihelmínticos, antiulcerogênicos entre outros. (VASUDEVA et al., 2009). A química do gênero caracteriza-se pela produção de isoflavonoides, flavonoides, proantocianidinas, xantonoides, neoflavonoides, cinamoilfenóis, benzofenonas e rotenoides. Na TABELA 1, estão apresentados alguns constituintes identificados no gênero segundo literatura.

TABELA 1 - ALGUNS CONSTITUINTES QUÍMICOS IDENTIFICADOS NO GÊNERO *Dalbergia*

Grupo químico	Espécie	Substância identificada
Isoflavonoides	<i>D. odorifera</i>	3-hidroxi daidzeína, Koparina, Formononetina, Prunetina
	<i>D. louvelli</i>	7,4 dihidroxi methoxi isoflavona
	<i>D. paniculata</i>	Caviunina, Dalpalatina, Dalpateína, Dalpanol, Milldurona
	<i>D. volubilis</i>	Biochanina A, Genisteína, Constanina, Odoratina,
	<i>D. olivera</i>	Olibergin A, Olibergin B
	<i>D. spinosa</i>	Dalspinina, dalspinosina
	<i>D. retusa</i>	Retusina
	<i>D. ecastophyllum</i>	lonchocarpan, equol, vesitol, mucronulatol, duartina
	<i>D. sissoo</i>	Tectorigenina
Isoflavona	<i>D. odorifera</i>	Violinone, Vestitone, Sativone
Flavona	<i>D. odorifera</i>	Butina, Pinocebrina, Liquiritigenina, isoliquiritigenina
Neoflavonoide	<i>D. odorifera</i>	Melanettina, Stevenina, Dalbergina
	<i>D. melanoxylon</i>	Melanoxina
	<i>D. volubilis</i>	Seshadrina, Volubolina
	<i>D. baroni</i>	Melanneína
	<i>D. parviflora</i>	Latifolina, Cearoína
Glicosídeos	<i>D. volubilis</i>	Volubilina, isovolubilina, volubilinin
	<i>D. lanceolaria</i>	Lanceolarina
	<i>D. sissoo</i>	sissotrina, isocaviudina, tectoridina, cavinnina-7-
	<i>D. paniculata</i>	cavinnina-7-rhamnoglucoside, paniculatina,
Quinonas	<i>D. latifolia</i>	Dalbergione
	<i>D. sissoo</i>	Dalbergenone
	<i>D. retusa</i>	Obtustaquinol, Obtustaquinona
Terpenóides e esteróis	<i>D. bupeana</i>	Kaiksaponina
	<i>D. sissooids</i>	Acido Oleanólico, sitosterol
	<i>D. monetaria</i>	Friedelina, estigmasterol, campesterol, sitosterol
Cinamil fenois	<i>D. cultrate</i>	Dalberatin A, Dalberatin B
	<i>D. nigrescens</i>	Dalberatin C, Dalberatin D
	<i>D. retusa</i>	4-cinamil-3-metoxicatocol, Obtustirene
	<i>D. miscolobium</i>	Violastirene, Isoviolastirene
Quinonas	<i>D. retusa</i>	Obtustaquinol, Obtustaquinone
	<i>D. latifolia</i>	Dalbergione
	<i>D. sissooids</i>	Sissoidenone
	<i>D. sissoo</i>	Dalbergenone (R), Dalbergenone(S)

FONTE: VASUDEVA et al.(2009); SAHA et al.(2013); DALARMI et al.(2015a).

2.2.1 Atividades Biológicas do Gênero *Dalbergia*

Algumas espécies deste gênero foram estudadas quanto a sua atividade biológica e os resultados experimentais demonstraram um grande potencial de atividades. (DALARMI et al., 2015a).

2.2.1.1 Atividades anti-inflamatória

Singh e Chaturvedi (1966) ao estudar a *Dalbergia lanceolaria*, demonstraram que a fração éter de petróleo, alcoólica e aquosa da espécie possui atividade contra artrite em ratos. Goda et al. (1992) isolaram dez compostos já conhecidos e cinco novos compostos fenólicos da espécie *Dalbergia odorifera* e avaliaram a capacidade destes em inibir a biossíntese de prostaglandinas, bem como a agregação de plaquetas induzidas pelo ácido araquidônico.

Hajare et al. (2000) avaliaram a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico das folhas de *Dalbergia sissoo* em diferentes modelos de inflamação em ratos. Utilizou-se a carragenina, a carragenina com caulim e a nistatina para indução de edema na pata dos animais. Com administração do extrato houve inibição do edema e do granuloma, gerado pela implantação de um pellet de algodão no abdome dos ratos. O extrato também inibiu a infiltração de corante em ensaio de permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos. Em testes agudos e crônicos, o extrato etanólico das folhas de *D. sissoo* não demonstrou efeito ulcerogênico na mucosa gástrica dos ratos. (HAJARE et al., 2000).

D. sissoo também foi estudada por Asif e Kumar (2009) para demonstrar o potencial anti-inflamatório do extrato etanólico do caule no modelo do edema de pata induzido pela carragenina. Neste mesmo modelo de investigação da atividade anti-inflamatória, Ganga et al.(2012) testaram o extrato metanólico de *Dalbergia paniculata* o qual apresentou significativa inibição do edema nas patas dos ratos. O extrato metanólico das folhas de *D. saxatilis* foi avaliado por Hassan et al. (2015) quanto sua atividade analgésica, anti-inflamatória e antipirética em ratos e confirmaram o uso tradicional da planta para dor de dente.

2.2.1.2 Atividade estimuladora da contração da musculatura uterina

Em 1999, Uchendu e Leek estudaram o mecanismo de contração do músculo uterino de ratos estimulado por um glicosídeo triterpenoide, o dalsaxin, isolado da raiz da *Dalbergia saxatilis*, por método *in vitro*. A dose de 200mg/kg utilizadas no período fértil, inibiu a concepção em 71,4% dos animais.

2.2.1.3 Atividade antiprotozoário

Várias isoflavonas foram isolados a partir da espécie *Dalbergia frutescens* por Khan et al. (2000). A partir destas, foi avaliada a atividade antiprotozoário contra a *Giardia intestinalis*. A isoflavona formononetina foi considerado o agente anti giardial mais potente, com um valor de IC₅₀ de 30 mg/mL, em comparação com o valor para metronidazol, a droga padrão de escolha, de 100 mg/mL.

Beldjoudi et al. (2003) isolaram quatro novos flavonóides e mais 13 compostos já conhecidos da espécie *Dalbergia louvelli* e avaliaram o potencial para inibir o crescimento de *Plasmodium falciparum*. Destes isolados, quatro apresentaram atividade, com IC₅₀ variando de 5,8-8,7 µM, nomeados de 4-methoxydalbergione, obtusafuran, 7,4-di-hidroxi-3-metoxiisoflavona e isoliquiritigenina.

2.2.1.4 Atividade citotóxica e preventiva do câncer

Cinco novos cinamilfenóis, dalberatin A, B, C, D, e E, foram isolados por Ito et al. (2003) a partir das espécies *Dalbergia gratidao* e *Dalbergia nigrescens* e foram testados quanto à sua atividade contra o vírus Epstein-Barr induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato em células Raji. O resultado da investigação indicou o potencial destes como agentes quimiopreventivos de câncer, promotores anti-tumoral.

Umehara et al. (2009) isolaram da espécie *Dalbergia parviflora* 5 novos compostos (dalparvin A,B,C; dalparvinol C; neokhriol A) juntamente com 11 já conhecidos. Os isolados foram avaliados quanto à sua atividade estimuladora da proliferação celular nas linhagens de câncer de mama humano T47D, MCF-7 e BT20. Em 2009, Umehara et al., isolaram desta mesma espécie 8 novos compostos

(khinones A,B,C,D,E; isodarparvinol B; dalparvin; sativanone) juntamente com 32 já conhecidos. Estes isolados também foram avaliados quanto à sua atividade de proliferação celular nas células neoplásicas T47D e MCF-7.

2.2.1.5 Atividade angiogênica

Em 2004, Wang et al., utilizaram 24 extratos aquosos de ervas tradicionalmente usadas para curar doença isquêmica do coração na China, para demonstrar atividade angiogênica *in vitro*. A atividade angiogênica foi determinada por quantificação de vasos na membrana corioalantóica de embrião de galinha e em modelo de proliferação celular de células endoteliais cultivadas na aorta bovina. Entre os extratos avaliados, o extrato de *Epimedium sagittatum*, *Trichosanthes kirilowii* e *Dalbergia odorifera*, mostraram potente atividade.

Kasa et al. (2015) avaliaram o efeito do extrato alcoólico das folhas de *D. sissoo* em lesões no miocárdio de ratos induzida por isoproterenol. Os ratos tratados com o extrato apresentaram melhora significativa na razão peso coração/peso corpóreo, áreas de infarte do miocárdio, frequência cardíaca e pressão arterial. Houve uma melhora no colesterol, LDL e triglicérides e nos marcadores de lesão cardíaca, LDH e CK-MB. O potencial antioxidante também foi aumentado por meio da avaliação da glutatona reduzida, superóxido dismutase e catalase. O exame histopatológico confirmou uma melhora no tecido cardíaco.

2.2.1.6 Atividade antidiarréica

Mujumdar et al. (2005) utilizaram o extrato etanólico da casca da *Dalbergia lanceolaria*, para apresentar atividade contra a diarreia induzidas por óleo de rícino e sulfato de magnésio e redução significativa do acúmulo de líquido intraluminal e motilidade intestinal.

Shrestha et al. (2008) isolaram da *D. sissoo* dois novos neoflavonoides, um novo flavonoide e uma flavona. Estes foram testados quanto a capacidade de evitar a produção de óxido nítrico, produzido pelas células J774.1 tipo macrófago e foram considerados potentes inibidores de óxido nítrico.

2.2.1.7 Atividade diurética

Jaiganesh et al (2009) demonstraram atividade diurética nos extratos da raiz da *Dalbergia spinosa*. O extrato alcoólico aumentou o volume de urina e de eletrólitos de sódio, potássio e cloreto, semelhante ao padrão furosemida.

2.2.1.8 Atividade antitrombótica e antiplaquetária

Estudos com o óleo essencial da *Dalbergia odorífera*, levaram Tao e Wang (2010) ao isolamento de dois sesquiterpenos, os quais foram avaliados quanto a atividade trombótica e antiplaquetária. Os resultados mostraram baixa atividade trombótica e acentuada atividade antiplaquetária.

2.2.1.9 Atividade antiulcerogênica

Cota et al. (2010), estudou a *D. monetaria* para tratamento de úlcera gástrica e identificou os mecanismos desta ação antiulcerogênica. O extrato liofilizado da espécie aumentou a síntese de prostaglandina E2 e reduziu o teor total de ácido do suco gástrico. Segundo autores, o efeito protetor do extrato liofilizado da espécies é devido à efeitos sinérgicos como, aumento da síntese de prostaglandinas E2 e o antagonismo da histamina e receptores beta- adrenérgicos, que reduzem a secreção de suco gástrico. O potencial gastroprotetor também foi estudado por Khan (2013) utilizando o extrato metanólico do caule da *D. sissoo* em úlceras induzidas por diclofenaco em ratos. A administração do extrato diminuiu o tamanho da úlcera, a peroxidação lipídica (TBARS), peróxido de hidrogênio e a atividade da mieloperoxidase na mucosa gástrica. Houve aumento das atividades de antioxidantes enzimáticos; catalase, superóxido dismutase, glutathione peroxidase, glutathione-S-transferase, glutathione reduzida e níveis de sulfidrilos não proteicos. A prevenção da úlcera, através da administração do extrato, ocorre por meio da eliminação de radicais livres. O volume do suco gástrico e a acidez foram reduzidas. Os resultados histológicos foram utilizados para confirmação.

2.2.1.10 Atividade espermatogênica

Em 2011, Vasudeva e Vats, demonstraram a atividade antiespermatogênica *in vitro* e *in vivo* do extrato etanólico da casca do caule da *D. sissoo*. Segundo o estudo, ocorreu um efeito dependente de dose e tempo do extrato sobre a motilidade e viabilidade do esperma. O extrato na concentração de 20 mg/mL causou imobilização completa em 3 minutos. No estudo *in vivo*, a dose de 200 mg/kg resultou em uma redução significativa no peso dos testículos em camundongos. Ocorreu diminuição também na mobilidade e contagem do esperma no epidídimo. Alterações histológicas do epidídimo e testículo dos camundongos também foram investigadas.

O extrato aquoso das folhas de *D. sissoo* foi estudado sobre a espermatogênese e a fertilidade em ratos machos. Histologicamente, os testículos dos ratos tratados com o extrato da espécie mostraram alterações degenerativas desiguais nos túbulos seminíferos. Reduções significativas foram observadas no nível sérico de testosterona, na motilidade do esperma, viabilidade e número. Não houve mudança de libido nos ratos, apenas a fertilidade foi suprimida. (VERMA; SINGH, 2014).

2.2.1.11 Atividade osteogênica

Dixit et al. (2012) isolaram da *D. sissoo* um novo glicosídeo de isoflavona, caviunin 7-O-[β -d-apiofuranosyl-(1 \rightarrow 6)- β -d-glucopiranosido], juntamente com uma série de isoflavonas, flavonas e glicosídeos. Todos os compostos foram avaliados quanto à atividade osteogênica em culturas de osteoblastos. O novo isolado e mais outros quatro constituintes aumentaram a atividade da fosfatase alcalina e a mineralização resultando no potencial osteogênico da espécie. Tal potencial, também foi demonstrado por Kumar et al.(2014) quando avaliaram essa atividade em neoflavonóides isolados da *D. sissoo*. Os resultados foram significativos para dalsissoal, dalbergin, dalbergiphenol, dalbergichromene, metil dalbergin e latinone; os quais apresentaram significativa atividade antiosteoporótica.

2.2.1.12 Atividade fotoprotetora

Ham et al. (2015) estudou os efeitos do extrato etanólico de *D. odorifera* em células da pele humana irradiada por UVB. O extrato e seus constituintes, dalbergin e sativanone, induziram a expressão do colágeno tipo I e o fator de crescimento (TGF- β 1) transformando em fibroblastos dérmicos humanos. Em camundongos sem pêlo expostos ao UVB, o extrato reduziu a formação de rugas e a espessura da pele. Esse efeito inibidor do extrato foi relacionado com a restauração do colágeno do tipo I, TGF- β 1 e elastina para níveis próximos de uma pele não exposta a radiação UVB. O estudo afirma que o extrato etanólico da espécie previne alguns efeitos de fotoenvelhecimento e mantém a integridade da pele por meio da regulação da degradação das proteínas da matriz extracelular.

2.2.1.13 Atividade antimicrobiana

Gundidza e Gaza (1993) avaliaram a atividade antimicrobiana das cascas de *Dalbergia melanoxylon* contra sete bactérias [quatro gram negativas: *Escherichia coli* (NCIB 8879), *Pseudomonas aeruginosa* (NCIB 950), *Salmonella typhimurium* (NCTC 1074) e *Yersinia pestis* (NCTC 10460), e três gram-positivas: *Bacillus subtilis* (NCIB 3610), *Klebsiella pneumoniae* (NCIB 418) e *Staphylococcus aureus* (NCIB 6571)] utilizando o método de difusão em poço, e também frente a dois fungos [*Candida albicans* (IMI 15954) e *Aspergillus niger* (IMI 17454)] pelo método de crescimento micelial. O extrato etanólico apresentou somente atividade antibacteriana e o extrato diclorometano apresentou significativa atividade antifúngica.

Em uma triagem com 191 extratos de plantas da Malásia foi avaliada a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em disco, do extrato metanólico das folhas e cascas de *Dalbergia parviflora* e *Dalbergia pseudosissoo* frente a *S. aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *E. coli* (ATCC 25922), *P. aeruginosa* (ATCC 27853) e *C. albicans* (ATCC 90028). Ambos os extratos apresentaram atividade somente contra *S. aureus*, sendo que o extrato das folhas de *D. pseudosissoo* e os extratos da casca e folhas de *D. parviflora* apresentaram fraca atividade (halos inferiores a 9,5 mm), enquanto o extrato da casca de *D. pseudosissoo* demonstrou moderada atividade antibacteriana (10-14,9 mm). (CHUNG et al., 2004).

Brijesh et al. (2006) avaliaram a atividade do extrato aquoso das folhas de *D. sissoo* frente a bactérias capazes de causar infecções diarreicas (*E. coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella flexneri* e *Campylobacter jejuni*, todas obtidas de isolados clínicos). Os autores verificaram que o extrato não apresentou atividade antibacteriana, embora atividade antidiarreica tenha sido detectada, pois o extrato atuou na virulência de bactérias reduzindo a produção de enterotoxinas, a aderência e, por consequência, a invasão bacteriana.

O extrato das raízes de *Dalbergia horrida*, foi avaliado através do método de difusão em disco frente a *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* obtidos de isolados clínicos. O extrato apresentou fraca atividade frente a *B. subtilis* e nenhuma atividade frente às outras cepas testadas. (NARAYANAN et al., 2007).

A atividade antimicrobiana da violanona e mucronulatol, isoflavonoides isolados de *Dalbergia oliveri*, foram avaliados frente a bactérias e fungos. As duas substâncias não apresentaram atividade frente às bactérias *S. aureus* (CIP 53154), *E. coli* (CIP 54127) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 28383), entretanto, ambos compostos inibiram os fungos fitopatogênicos *Alternaria brassicicola* e *Fusarium oxysporum*. (DEESAMER et al., 2007).

A avaliação da atividade antibacteriana do extrato etanólico da casca de *Dalbergia subcymosa* frente a bactérias padrão ATCC [*Proteus mirabilis* (ATCC 7022), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 27858), *P. aeruginosa* (ATCC 27853), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 29213), *E. faecalis* (ATCC 29212) e *Streptococcus pneumoniae* (ATCC 46619)] foi verificada através do método de difusão em disco, por Correia et al. (2008), em uma triagem com 10 extratos de diferentes espécies coletadas na região da Amazônia. Os autores verificaram que o extrato de *D. subcymosa* apresentou atividade apenas frente *S. aureus*.

O extrato etanólico das folhas e cascas de *D. saxatilis* foi investigado frente a cinco microrganismos patogênicos padrão ATCC (*S. aureus* ATCC 13709, *E. coli* ATCC 9637, *C. albicans* ATCC 10231, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* ATCC 10031) e a um isolado clínico (*B. subtilis*). O extrato das folhas apresentou atividade somente frente a *S. aureus*, na concentração inibitória mínima (CIM) de 1000 µg/mL, enquanto o extrato da casca apresentou CIM de 1000 µg/mL frente às bactérias *E. coli* e *P. aeruginosa*, e CIM de 250 µg/mL e 125 µg/mL para *S. aureus* e *B. subtilis*, respectivamente. (OKWUTE et al., 2009).

2.2.1.14 Atividade antioxidante

Cheng et al. (1998) demonstram que a buteína, isolada de *Dalbergia odorifera*, serve como um poderoso antioxidante contra a peroxidação lipídica e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) pela eliminação de radicais livres e quelação de íons metálicos. Dois novos flavonoides, 4,2,5-trihidroxi-4-metoxichalcone e 6,7,4-trihidroxi-flavan, foram isolados do caule de *D. odorifera* e demonstrado seus efeitos protetores sobre a lesão oxidativa induzida por glutamato em células HT22. (An et al., 2008)

Roy et al. (2011) realizaram um estudo de atividade antioxidante utilizando o extrato aquoso e metanólico da casca da espécie *D. sissoo*. Um novo método baseado em nanopartículas de ouro foi desenvolvido para avaliar a atividade antioxidante da planta. Além deste, foram utilizados os métodos: redução do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), redução do íon ferro e atividade quelante do íon ferro. O extrato metanólico da *D. sissoo* demonstrou um grande potencial antioxidante.

Promden et al. (2014) isolaram 24 isoflavonoides da *D. parviflora*. Estes isolados, segundo a relação estrutura/atividade, foram avaliados quanto à propriedade antioxidante por três métodos, xantina/xantina oxidase, ORAC, DPPH. A comparação mostrou que o grupo das isoflavonas obtiveram a maior capacidade antioxidante.

2.2.1.15 Atividade larvicida

Ansari et al. (2000) avaliaram a atividade larvicida do óleo essencial de *Dalbergia sissoo* em *Anopheles stephensi*, *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, e verificaram que houve 100% de mortalidade para *C. quinquefasciatus* (4 mL/m² em 24 horas), 90% para *A. aegypti* e 60% para *A. stephensi*. A aplicação do óleo, aplicado em partes do corpo de voluntários humanos exposta aos mosquitos, também demonstrou ação repelente.

Okwute et al. (2009) demonstraram o potencial da *D. saxatilis* na agricultura e na medicina por meio da atividade protetora, inseticida e antimicrobiana da espécie. As folhas secas em pó foram utilizadas como agente de controle da praga de feijão-caupi, *Callosobruchus maculatus*. Os danos foram drasticamente reduzidos quando

as sementes do feijão foram tratadas com as folhas em pó da *D. saxatilis* na dose de 0,75g / 150 sementes. Ocorreu redução nos danos na colheita, oviposição e desenvolvimento larval, sem afetar a viabilidade das sementes. O extrato bruto etanólico 95% e a fração hexânica da casca da espécie mostraram atividade inseticida sobre mosquitos adultos.

2.3 CONSIDERAÇÕES SOBRE A ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*, Vogel

De acordo com Cronquist (1981), a *D. brasiliensis* possui o enquadramento taxonômico demonstrado na TABELA 2.

TABELA 2 - ENQUADRAMENTO TAXONÔMICO DA *D. brasiliensis*

Classificação taxonômica	
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Magnoliopsida (Dicotyledonea)
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Gênero	<i>Dalbergia</i>
Espécie	<i>Dalbergia brasiliensis</i> , Vogel

FONTE: CRONQUIST, 1981

2.3.1 Sinonímia vulgar

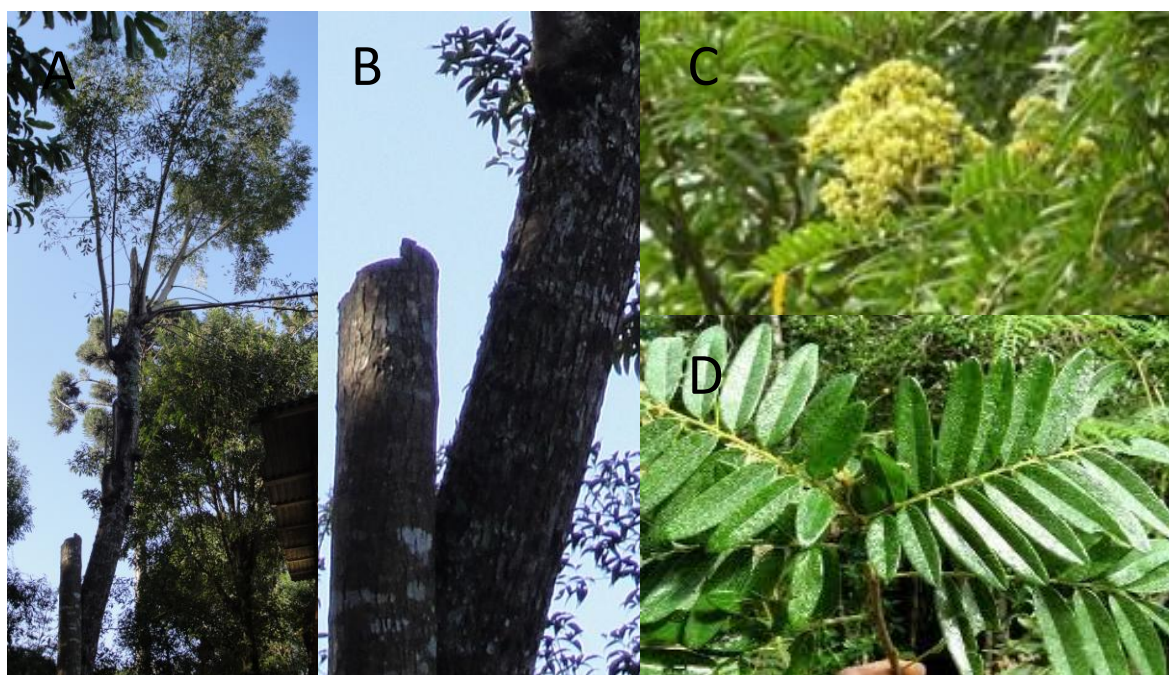
A *D. brasiliensis* recebe outros nomes populares como, caroaba-brava (São Paulo), caviúna (Minas Gerais e São Paulo), caviúna-preta (Paraná e São Paulo), jacarandá, jacarandá graúdo, jacarandá rosa, jacarandá miúdo (Paraná), marmeleiro (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina). (CARVALHO, 2004).

2.3.2 Descrição Botânica

A espécie *D. brasiliensis* é uma arvoreta à árvore caducifolia (FIGURA 1A), com 4 a 20 m de altura e 20 a 50 cm de diâmetro à altura do peito (DAP). (CARVALHO, 2004). Seu tronco é cilíndrico, reto a levemente tortuoso e acanalado, nas árvores velhas. Fuste em média com 8 m de altura, variando de 2,5 a 13 m de

comprimento. (IVANCHECHEN, 1988). Ramificação racemosa e dicotômica. Copa alta e ampla. Casca com até 11 mm (FIGURA 1B). A casca externa é acastanhada, levemente áspera e rugosa, com fissuras verticais pouco profundas e com desprendimento em placas irregulares, com muitas lenticelas horizontais. A casca interna é de coloração amarelada, com textura fibrosa e estrutura laminada, com oxidação lenta. As flores (FIGURA 1C) são amarelas a creme, perfumadas, com 4 a 6 mm de comprimento, em inflorescência paniculadas, terminais e nas últimas axilas foliares. O fruto, sâmara monosperma, possui 3 a 5 cm de comprimento por 1,2 a 1,5 cm de largura. A semente é achatada, marron-amarelada, com 10 a 13 mm de comprimento por 4 a 7 mm largura. As folhas (FIGURA 1D) são compostas, imparipenadas, ráquis com 12 a 15 cm de comprimento e 13 a 27 pares de folíolos linear. (CARVALHO, 2004).

FIGURA 1 - IMAGENS DA ÁRVORE, TRONCO, FLOR E FOLHAS DE *D. brasiliensis*



FONTE: O autor (2012)

NOTA: A: Árvore, B: Tronco, C: Flores. D: Folhas

A *D. brasiliensis* é uma planta hermafodita. Sua polinização acontece por meio de abelhas e outros insetos. O período de floração é de novembro a janeiro, no Estado de São Paulo e, de novembro a abril, no Paraná. Os frutos amadurecem de abril a agosto no Paraná e de abril a outubro em São Paulo. (CARVALHO, 2004).

A espécie ocorre naturalmente em solos de baixa fertilidade, possui um crescimento lento a moderado, conforme demonstrado na TABELA 3, e está no grupo das espécies com silvicultura no Paraná. (CARVALHO, 1988). O crescimento inicial em altura e em diâmetro é moderado, com incremento anual médio de até 1,39 m e 1,6 cm, respectivamente, seis anos após o plantio. Na cidade de Laranjeiras do Sul, Paraná, o Jacarandá apresentou alturas individuais variando de 0,2 a 2,04 m aos 12 meses. (CARVALHO et al., 1987).

TABELA 3 - CRESCIMENTO DA *D. brasiliensis* EM EXPERIMENTOS, NO PARANÁ E EM MINAS GERAIS

Local	Idade (anos)	Espaçamento (m X m)	Plantas vivas (%)	Altura média (m)	DAP médio (m)
Adrianópolis, PR	2	4 X 2,5	60	2,36	-
Campo Mourão, PR	4	2 X 2	100	2,41	3
Campo Mourão, PR	8	4 X 2	83,3	9,29	13
Cianorte, PR	7	3 X 3	100	7,53	7,6
Colombo, PR	7	8 X 3	41	4,68	3,9
Dionísio, MG	6	3 X 2	86	4,2	4,8
Foz do Iguaçu, PR	4	4 X 3	80	5,08	5,2
Laranjeiras do Sul, PR	1	3 X 2	98	1,23	-
Laranjeiras do Sul, PR	6	3 X 3	46	5,97	7,6

FONTE: Adaptado de CARVALHO (2004)

NOTA: DAP: Diâmetro à altura do peito (medido perpendicularmente a altura de 1,30m do solo)

A madeira do Jacarandá é moderadamente densa. O cerne possui cor amarelo-pálido à bege, mesmo em árvores velhas, ou com cerne irregularmente demarcado de cor marrom-rosado, com listras escuras. (BURGER, 1979). A madeira é utilizada em carpintaria, marcenaria, tabuado, obras externas, esteios, vigas e cabos de ferramentas. Por apresentar belos efeitos decorativos, também é utilizada na fabricação de instrumentos musicais, móveis finos e painéis decorativos. (CARVALHO, 2004). A espécie *Dalbergia nigra*, conhecida como jacarandá da Bahia, possui uma das madeiras brasileiras mais valorizadas economicamente. (GASSON, 2010).

2.3.3 Ocorrência da *Dalbergia brasiliensis*

D. brasiliensis ocorre de forma natural no Brasil (Cerrado e Floresta Atlântica), nos estados de Minas Gerais, Paraná, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina e São Paulo, conforme ilustrado na FIGURA 2. (LIMA, 2015).

FIGURA 2 - OCORRÊNCIA *D. brasiliensis* NO BRASIL



FONTE: LIMA (2015)

2.3.4 Dados fitoquímicos da *Dalbergia brasiliensis*

2.3.4.1 Obtenção dos extratos brutos e frações da *Dalbergia brasiliensis*

Dalarmi (2012) obteve o extrato etanólico bruto da espécie a partir das folhas e das cascas do caule, em aparelho extrator de Soxhlet com rendimentos expressos na TABELA 4.

TABELA 4 - RENDIMENTO DOS EXTRATOS BRUTOS OBTIDOS DAS FOLHAS E CASCAS DA *D. brasiliensis*

Parâmetro	<i>Dalbergia brasiliensis</i>	
	Folhas	Cascas
Quantidade inicial de material vegetal utilizada	4070 g	2800 g
Massa do extrato bruto	494,91g	364,56g
Rendimento do extrato bruto	12,16%	13,02%

FONTE: DALARMI (2012)

As frações hexano, clorofórmio e acetato de etila foram obtidas por partição líquido/líquido em Soxhlet conforme Carvalho et al. (2009) e patente PI0601203-7.

Iniciou-se o particionamento utilizando 406,6 g do extrato bruto das folhas e 338,5 g do extrato bruto das cascas. (DALARMI, 2012). Os rendimentos estão apresentados na TABELA 5. Os extratos e frações obtidas foram os mesmos utilizados no presente estudo, para realização dos ensaios experimentais.

TABELA 5 - RENDIMENTO DAS FRAÇÕES DA *D. brasiliensis*

Material vegetal	Fração	Massa seca obtida (g)	Rendimento (%) em relação à massa seca
Folha	Hexano	82,02	20,17
	Cloroformio	25,94	6,38
	Acetato de Etila	38,88	9,56
Casca	Hexano	11,21	3,31
	Cloroformio	25,28	7,46
	Acetato de Etila	10,68	3,15

FONTE: DALARMI (2012)

2.3.4.2 Ensaio sistemático de análise fitoquímica da *Dalbergia brasiliensis*

Visando a identificação dos principais grupos químicos presentes nas folhas e nas cascas do caule, Dalarmi (2012) realizou o ensaio sistemático de análise fitoquímica utilizando metodologias descritas por Moreira (1979) e Miguel (2003) com adaptações, cujos resultados estão apresentados na TABELA 6.

TABELA 6 - RESULTADO DO ENSAIO SISTEMÁTICO DE ANÁLISE FITOQUÍMICA DA *D. brasiliensis*

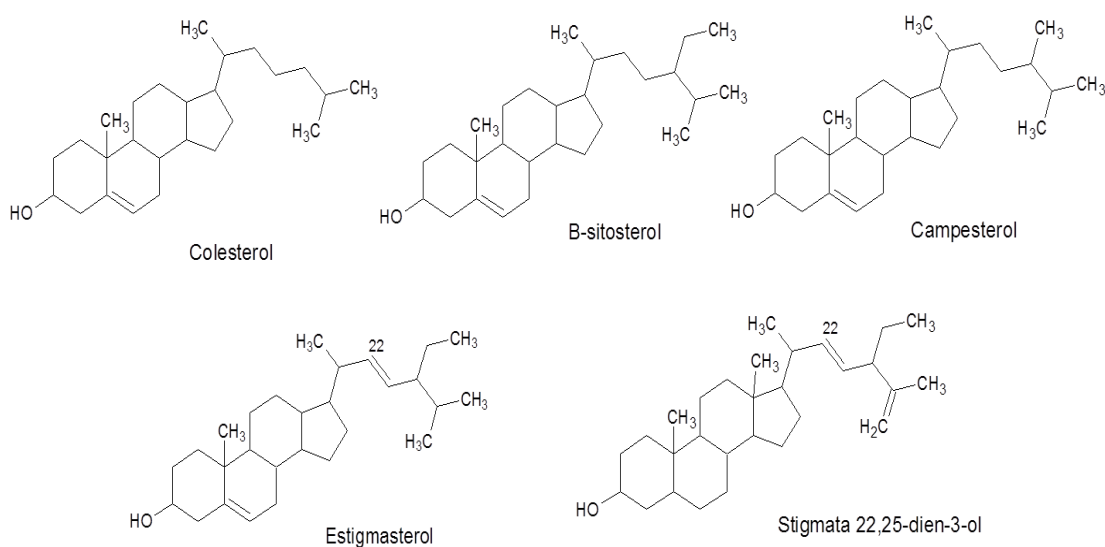
	Resultado positivo	Frações
Casca	Flavonóide	Cloroformio e Acetato de Etila
	Esteroides / triterpenos	Hexano, Cloroformio e Acetato de Etila
	Iridoides	Clorofórmio
	Taninos condensados	
Folha	Flavonóide	Cloroformio e Acetato de Etila
	Esteroides / triterpenos	Hexano, Cloroformio e Acetato de Etila
	Taninos condensados	

FONTE: DALARMI (2012)

2.3.4.3 Compostos identificados da *Dalbergia brasiliensis*

Dalarmi (2012) identificou na fração hexano da casca da *D. brasiliensis* uma mistura de cinco esteróides: colesterol, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e stigmata 22-25-dien-3-ol, os quais têm suas estruturas químicas ilustradas na FIGURA 3.

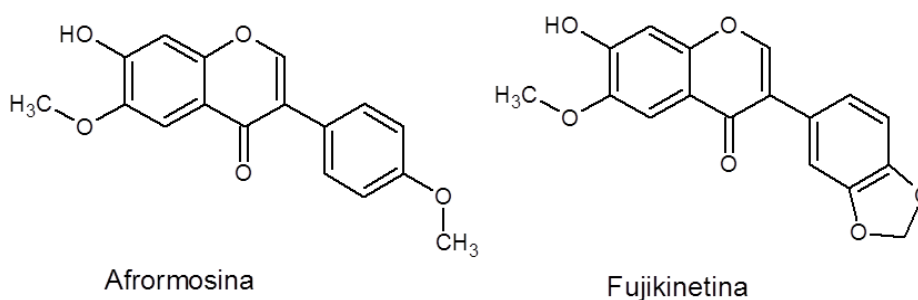
FIGURA 3 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ESTEROIDES IDENTIFICADOS NA FRAÇÃO HEXANO DA CASCA DA *D. brasiliensis*



FONTE: DALARMI (2012)

Na fração clorofórmio da casca de *D. brasiliensis* foi identificada uma mistura de dois isoflavonoides: afrormosina e fujikinetina, cujas estruturas químicas estão ilustradas na FIGURA 4.

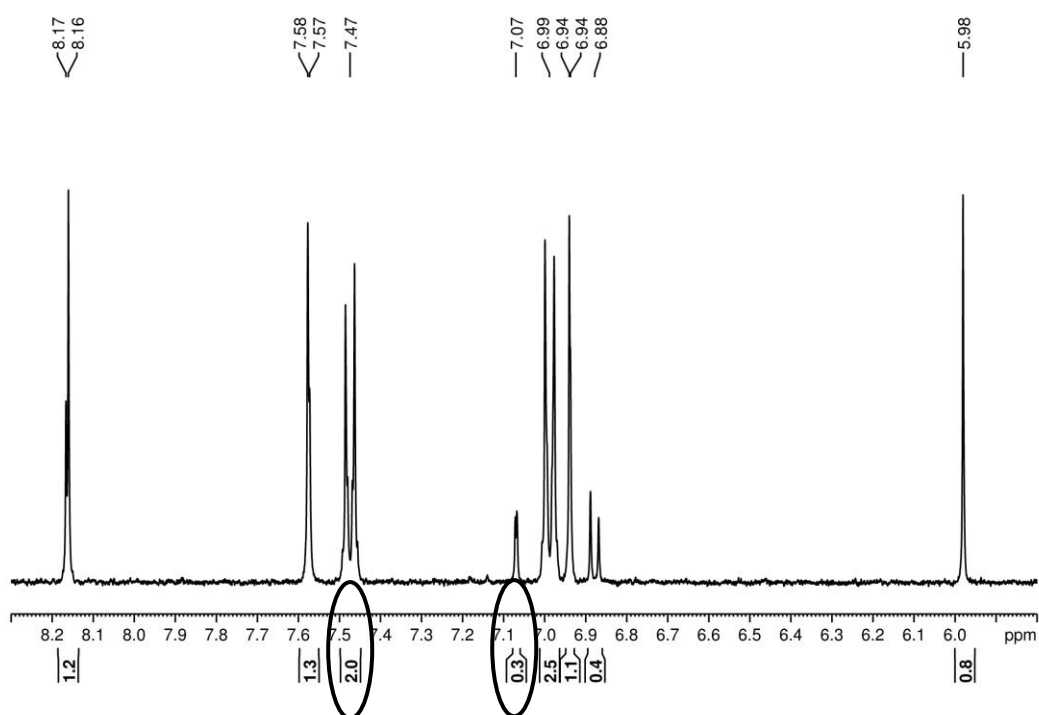
FIGURA 4 - ESTRUTURAS QUÍMICAS DOS ISOFLAVONOIDES AFRORMOSINA E FUJIKINETINA DA FRAÇÃO CLOROFÓRMIO DA CASCA DA *D. brasiliensis*



FONTE: DALARMI (2012)

Análises do espectro de RMN ^1H , mostraram que a afrormosina está em uma concentração mais alta, uma vez que seus sinais foram mais intensos. O espectro de RMN de ^1H permitiu identificar, além dos compostos, a proporção entre eles, medindo as integrais dos sinais das moléculas em questão, conforme FIGURA 5. Utilizaram-se os sinais que estavam isolados no espectro para realização do cálculo. No caso da afrormosina, o sinal mais isolado no espectro de RMN de ^1H , foi o sinal em 7,47 ppm, que é relativo aos hidrogênios 2' e 6' do anel B. Assim, definiu-se a integral deste sinal para 2, já que corresponde a 2 hidrogênios. Todas as outras integrais foram calculadas em relação a este sinal. O sinal da fujikinetina mais isolado dos demais foi em 7,07 ppm, equivalente ao hidrogênio 6' da molécula, cuja integral, calculada em relação à integral da afrormosina, é 0,3. Dessa forma, chegou-se na proporção de 3:1 (Afrormosina:fujikinetina). (DALARMI, 2012).

FIGURA 5 - ESPECTRO EXPANDIDO DE RMN ^1H DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA MOSTRANDO SINAIS MAIS INTENSOS PARA AFRORMOSINA



FONTE: DALARMI (2012)

2.3.5 Atividade Antioxidante da *Dalbergia brasiliensis*

Dalarmi et al. (2017), estudou a atividade antioxidante da espécie por três metodologias (TABELA 7); método do sequestro de radicais 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), redução do complexo fosfomolibdênio e determinação de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).

TABELA 7 - RESULTADOS DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTES DAS FRAÇÕES DA *D. brasiliensis*

Amostra	Fosfomolibdênio		DPPH	TBARS
	AA em relação à rutina (%)	AA em relação ao ácido ascórbico (%)	IC ₅₀ (µg/mL) ± dp	IA(%)
EBF	45,78	11,67	72,476 ± 1,0293	30,16
FHF	102,81	26,22	165,602 ± 2,1437	51,57
FCF	190	48,46	42,343 ± 1,1240	43,21
FAEF	93,75	23,91	40,629 ± 0,1384	36,88
EBC	50,93	13,23	48,303 ± 0,6064	34,12
FHC	73,98	17,6	273,868 ± 2,1608	33,95
FCC	105,01	24,57	43,572 ± 1,0178	34,7
FAEC	123,82	28,98	47,310 ± 0,1298	41,87
Ácido Ascórbico			4,503 ± 0,0507	
Rutina			7,330 ± 0,1168	
BHT				54,03%

FONTE: DALARMI et al.(2017)

NOTA: AA: atividade antioxidante; IA: índice antioxidante; EBF: extrato bruto da folha; FHF: fração hexânica da folha; FCF: fração clorofórmica da folha; FAEF: fração acetato de etila da folha; EBC: extrato bruto da casca; FHC: fração hexânica da casca; FCC: fração clorofórmica da casca; FAEC: fração acetato de etila da casca.

Como resultado da atividade antioxidante pelo método da redução do radical DPPH, foi comparado os resultados com os padrões ácido ascórbico (IC₅₀ = 4,503 µg mL⁻¹) e rutina (IC₅₀ = 7,330 µg mL⁻¹) observou-se melhores resultados nas frações clorofórmio (42,343 µg mL⁻¹) e acetato de etila (40,629 µg mL⁻¹) das folhas.

Na atividade antioxidante pela redução do complexo do fosfomolibdênio, utilizaram-se os padrões ácido ascórbico e rutina, com atividades consideradas

100%. As frações hexano e clorofórmio da folha e as frações clorofórmio e acetato de etila da casca, superaram a atividade da rutina em 2%, 90%, 5% e 23% respectivamente. A fração acetato de etila da folha também se destacou com 93% de atividade em relação à rutina. Comparando os resultados ao ácido ascórbico, a fração clorofórmio da folha apresentou o melhor desempenho com atividade de 48%.

No ensaio TBARS, a fração hexano da folha, com atividade de 51%, e a fração acetato de etila da casca, 41%, destacaram-se quando comparadas ao padrão BHT que obteve 54% de atividade antioxidante.

2.3.6 Ensaio preliminares de toxicidade da *Dalbergia brasiliensis*

Vários trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre *Artemia salina* com atividades antifúngica, viruscida, antimicrobiana, tripanossomicida e parasiticida. (MEYER et al., 1982). Dalarmi (2012) observou que os extratos brutos e frações da *D. brasiliensis* não possuem toxicidade contra o micro crustáceo, a IC_{50} obtido para todas as amostras foi superior a 1000 $\mu\text{g/mL}$, concentração máxima para ser considerada ativa segundo Meyer et al. (1982). Este resultado foi confirmado na avaliação da atividade hemolítica, em tubos e em placas de agar sangue, onde os extratos e frações da espécie demonstraram não possuir toxicidade sobre os eritrócitos. (DALARMI, 2012).

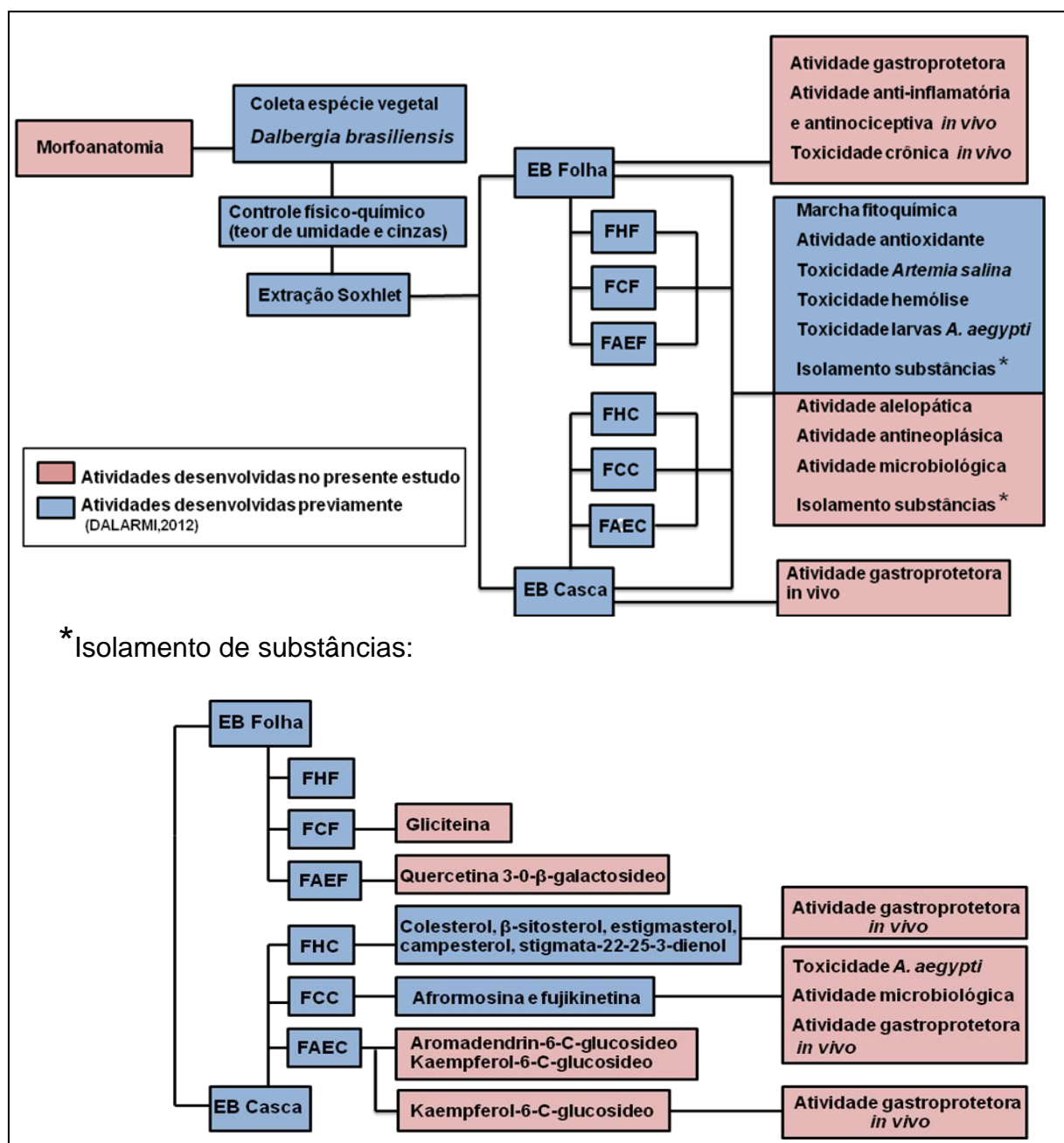
2.3.7 Atividade Larvicida da *Dalbergia brasiliensis*

Segundo Dalarmi et al (2015b) todos os extratos e frações da *D. brasiliensis* provocaram mortalidade nas larvas de *Aedes Aegypti*, no 3º estágio de desenvolvimento, indicando o efeito larvicida. Os resultados obtidos para a IC_{50} e IC_{90} demonstraram que a fração clorofórmio da casca (25 e 50 $\mu\text{g/mL}$) e fração acetato de etila da folha (24 e 66 $\mu\text{g/mL}$) obtiveram resultados mais significativos. O estudo também demonstrou as alterações morfológicas das larvas (exoesqueleto rígido, de fácil rompimento e com alongamento na parte anterior ao tórax) ao serem expostas aos extratos da espécie.

3 MATERIAL E MÉTODOS

As etapas da pesquisa são demonstradas no fluxograma apresentado na FIGURA 6.

FIGURA 6 - FLUXOGRAMA DA PESQUISA COM A ESPÉCIE *Dalbergia brasiliensis*



NOTA: Atividades desenvolvidas durante período do mestrado: preenchimento cor azul. Atividades desenvolvidas durante período do doutorado: preenchimento cor rosa. EBF: extrato bruto folha, FHF: fração hexano folha, FCF: fração clorofórmio folha, FAEF: fração acetato de etila folha, EBC: extrato bruto casca, FHC: fração hexano casca, FCC: fração clorofórmio casca, FAEC: fração acetato de etila casca.

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As folhas e cascas de *D. brasiliensis* foram coletadas em março de 2010 em Curitiba, Paraná, Brasil, na localização via GPS S25°26'48.0" W49°20'51.2". A identificação taxonômica foi realizada pelo botânico e curador Osmar dos Santos Ribas no Herbário do Museu Botânico de Curitiba, voucher nº 189342.

O material botânico foi seco em temperatura ambiente por 10 dias e fragmentado em moinho de facas. Foram obtidos 4.200 g de folhas e 3.100 g de cascas de caule de *D. brasiliensis* que permaneceram armazenados em sacos plásticos, até o momento da extração.

Os extratos etanólicos brutos, obtidos por meio do aparato de Soxhlet, foram utilizados para a obtenção das frações hexano, clorofórmio e acetato de etila, conforme Dalarmi (2012). Os extratos e frações secas das folhas e das cascas foram armazenados em frascos de vidro e protegidos de calor e umidade. Estes foram utilizados para a realização dos ensaios biológicos realizados no mestrado e no presente estudo do autor.

O estudo possui autorização do IBAMA para acesso ao patrimônio genético por meio da Autorização n.º03/2014 (ANEXO 1), para fins de pesquisa científica, atendendo os requisitos descritos na resolução nº 35, de 27 de abril de 2011 que dispõe sobre a regularização de atividade de acesso ao patrimônio genético. (BRASIL, 2011).

3.2 ESTUDO MORFOANATÔMICO

Para a análise morfoanatômica foram utilizadas folhas adultas e fixadas em FAA 70 (formol, ácido acético glacial e álcool etílico a 70%). O tempo mínimo para fixar as amostras foi de 18 horas. A fixação foi realizada para bloquear imediatamente o metabolismo das células, preservando-as. (JOHANSEN, 1940). Para a preservação das folhas adultas utilizou-se álcool etílico a 70%. (BERLYN; MIKSCHE, 1976).

As dimensões da planta foram estabelecidas através da metragem (comprimento e largura) por meio de média simples. Para as dimensões das folhas, foi utilizado o paquímetro digital (CD-15CX, Mitutoyo). A terminologia empregada

para análise macroscópica seguiu Stearn (1983) e para a microscópica Metcalfe e Chalk (1950).

3.2.1 Lâminas semipermanentes

Para montagem das lâminas semipermanentes, foram realizados cortes à mão livre do material vegetativo fixado, paradérmicos e transversais, com o auxílio de isopor como suporte. (QUINTAS, 1963). A coloração foi efetuada por azul de astra e a safranina, corando estruturas acidófilas e basófilas, respectivamente. (ROESER, 1972). Foram analisados caule, pecíolo e foliolo. As lâminas foram montadas com glicerina a 50% (v/v) com intuito de preservar o material. (BERLYN; MIKSCHE, 1976) e para a luteação foi utilizado esmalte incolor. (BECAK; PAULETE, 1976). O material foi observado e fotografado no microscópio Olympus BX40 em aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x.

3.2.2 Testes microquímicos

Para os testes microquímicos foram utilizados cinco indivíduos e retirados caules e folhas adultos que estavam fixados em FAA, exceto para os testes de terpenoides com grupo carbonila que foram usados materiais frescos. Foram realizados cortes transversais à mão livre, na porção mediana, selecionados os melhores cortes, aplicados os reagentes de acordo com cada teste, lavados em água destilada e montados na lâmina com glicerina a 50%. Em seguida, os resultados foram observados e fotografados em microscópio fotônico nos aumentos de 4x, 10x, 20x e 40x (BX40, Olympus®).

Nos ensaios microquímicos utilizaram-se várias metodologias conhecidas. Para a detecção de amido, lugol (BERLYN; MIKSCHE, 1976); para lipídios totais, utilizou-se Sudan III (PEARSE, 1980); para terpenoides com grupo carbonila, 2,4-dinitrofenil-hidrazina (GANTER; JOLLÉS, 1969); para lignina, floroglucinol-HCl (JOHANSEN, 1940); para compostos fenólicos gerais, cloreto férrico (JOHANSEN, 1940). Seções controle foram realizadas simultaneamente aos testes histoquímicos, conforme procedimento padrão. Para a verificação do aspecto natural dos órgãos e das secreções, foram montadas e observadas algumas seções sem tratamento.

3.2.3 Microscopia Eletrônica de Varredura

A análise ultraestrutural de superfície em microscópio eletrônico de varredura (MEV) foi empregada segundo Souza (1998). As amostras (partes aéreas) acondicionadas em FAA 70 sofreram uma desidratação etanólica crescente (80%, 90% e 100%). Essas amostras foram inseridas em uma câmara preenchida com álcool absoluto e colocadas no aparelho de ponto crítico (CPD-030, Balt-Tec®). Nessa fase, ocorreu a substituição completa de álcool etílico por CO₂ para que o material ficasse completamente seco. O material, após ponto crítico, foi aderido com uma fita de cobre a um suporte do MEV e metalizado com ouro no aparelho SCD-030, Balzers®. Essa etapa tem como finalidade o aumento da condutividade da superfície da amostra devido à presença da fina camada de metal, que através de bombeamento de íons pesados de argônio, os átomos de ouro se depositam sobre as reentrâncias e proeminências da superfície da amostra. A última etapa foi a observação e a análise no microscópio eletrônico de varredura (JSM 6360LV, JEOL®) o qual produz imagens tridimensionais.

3.2.4 Microtomografia computadorizada

A técnica de microtomografia foi utilizada para a análise microscópica, com a finalidade de observar as estruturas do tecido de *D. brasiliensis*, sem necessitar de tratamento com corantes ou outros. A vantagem desta análise é que ela permite a visualização de centenas de seções internas das amostras, permitindo também quantificar a área ou volume do material analisado. (FERNANDES et al., 2009).

As análises da folha, caule e casca de *D. brasiliensis* foram desenvolvidas no laboratório de análise de Minerais e Rochas (LAMIR) da UFPR, em equipamento Skyscan, modelo 1172. No momento das análises, foram realizadas 4 etapas, sendo estas: 1- aquisição das imagens, 2- reconstituição das seções microtomográficas obtidas, 3- seleção da região de interesse para tratamento binário e análise, 4- construção do volume da imagem em 3D. Estas análises foram realizadas baseadas na proposta de Fernandes et al. (2009).

Na aquisição das imagens, foi utilizada uma resolução de 5 µm, sendo que este valor é atribuído ao tamanho do pixel, que resulta em um tempo de aquisição

de 30 minutos. Para esta etapa, foi utilizado o equipamento Skyscan 1172 acoplado ao software skyscan 1172 Control program.

A amostra foi submetida à rotação de 360° , com movimentos randomizados, nos quais são adquiridas projeções bidimensionais, paralelas ao eixo vertical da amostra, com rotação de $0,27^\circ$. Para a aquisição das imagens, são utilizados 4 computadores com 4 gigas de memória RAM cada, para que sejam geradas várias imagens no formato TIFF. Em seguida, foi realizada a reconstituição das seções microtomográficas, com a finalidade de gerar imagens horizontais da amostra como se estas estivessem cortadas em fatias. A reconstrução das imagens foi realizada pelo software NRecon®, que se baseia em um algoritmo matemático. Esse processo demanda várias horas de trabalho, pois gera cerca de 2.000 imagens para cada amostra. Em seguida, as regiões de interesse foram selecionadas para processamento das imagens, formando um paralelepípedo de $4000 \times 1500 \times 1500 \mu\text{m}$ a partir de cada amostra, para gerar o volume virtual 3D da região escolhida.

Após a seleção, foi realizada a binarização, baseada em uma escala de cinza, variando entre 0 a 255 tons. Esta foi utilizada para definir as diferentes fases do material analisado, a partir disso, gerou-se um arquivo com volume de cada porção. Por fim, as figuras selecionadas foram convertidas em imagens bidimensionais e tridimensionais em formato JPG e TIFF.

3.3 PURIFICAÇÕES DAS FRAÇÕES E ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

A purificação das frações foi realizada através da cromatografia em coluna. As frações foram solubilizadas em metanol e incorporadas à aproximadamente 18 g de sílica-gel 60 para formação das pastilhas e posteriormente levada à secura em banho maria a 50°C .

A eluição iniciou com solvente hexano e gradiente crescente de polaridade de 10% com solvente acetato de etila. Com 100% de acetato de etila, iniciou-se a eluição de acetato de etila / metanol com gradiente de 10 em 10% até 100% de metanol. As amostras foram recolhidas em frascos de vidro de aproximadamente 10 ml e levadas a secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Nos frascos com precipitados, as amostras foram ressuspensas e filtradas para se obter os cristais. Realizou-se cromatografia em camada delgada utilizando

cromoplacas de Silica-gel 60 F254 Merck® e visualizadas com lâmpada UV nos comprimentos de onda de 360 nm.

As substâncias isoladas foram submetidas às análises espectrométricas para elucidação de sua estrutura. Todos os experimentos de ressonância magnética nuclear (RMN) foram realizados em um espectrômetro de RMN Bruker® Avance III 600 MHz, observando os núcleos de ^1H a 600,13 MHz, equipado com uma sonda inversa quadrinuclear de 5 mm com gradiente z. Todos os deslocamentos químicos foram observados em relação ao sinal do TMS, em 0,00 ppm como referência interna.

3.3.1 Fração clorofórmio da folha

Após a purificação da fração clorofórmio em cromatografia em coluna, os frascos contendo as amostras foram levada a secura em temperatura ambiente para cristalização dos compostos. Os frascos 36-46 foram submetidos a coluna cromatográfica Sephadex eluída com metanol e água (70:30). Os frascos 5-7 com precipitado, foram ressuspendidos e filtrados até obtenção de 10 mg de isolado. Realizou-se cromatografia em camada delgada para verificação da pureza com a fase móvel constituída de acetato de etila, ácido fórmico, ácido acético e água (100:11:11:27) e como revelador o reativo NEU (difênilboriloxietilamina 1% em metanol seguido de polietilenoglicol-4000 5% em etanol). Uma amostra do isolado obtido (10 mg) foi dissolvida em cloroformio deuterado e analisada em espectrômetro de RMN Bruker® Avance III 600 MHz.

3.3.2 Fração acetato de etila da folha

Após a purificação da fração acetato de etila em cromatografia em coluna, os frascos 32-44 foram submetidos à coluna cromatográfica Sephadex eluída com metanol e água (70:30). Nos frascos 4-7 com precipitado, a amostra foi ressuspendida e filtrada.

Para auxiliar a separação foi realizada cromatografia de camada delgada (CCD) preparativa, onde a amostra foi aplicada, com o auxílio de um capilar, em placas cromatográficas com sílica-gel GF 254nm (20 cm de largura e 10 cm de altura). A aplicação foi realizada em forma de linha ou barra. Em seguida, a placa foi

mantida em contato com a fase móvel constituída de acetato de etila, acetona e água (15:8:5), em recipiente fechado, até saturação da cuba. As bandas formadas foram raspadas e o resíduo ressuspendido. Posteriormente foi realizada a filtração para separar a sílica da CCD da substância dissolvida no seu solvente. A sílica ficou retida no filtro sinterizado e o eluato foi coletado em um frasco previamente tarado. O frasco com a amostra foi levado à secura, obtendo-se 11 mg de isolado. A amostra foi dissolvida em metanol deuterado e analisada em espectrômetro de RMN Bruker® Avance III 600 MHz.

3.3.3 Fração acetato de etila da casca

Após a purificação da fração acetato de etila em cromatografia em coluna, os frascos 52-67 foram submetidos a coluna cromatográfica Sephadex eluída com metanol e água (70:30). Posteriormente, os frascos 9, 10 e 11 com precipitado foram ressuspendidos e filtrados. Este material foi submetido à eluição em placa cromatografica preparativa de sílica gel 60 GF 254nm (20 cm de largura e 10 cm de altura). A aplicação foi realizada em forma de linha ou barra. Em seguida, a placa foi mantida em contato com a fase móvel constituída de acetato de etila, acetona e água (15:8:5), em recipiente fechado, até saturação da cuba. Duas bandas formadas foram raspadas e o resíduo ressuspendido. Posteriormente foi realizada a filtração para separar a sílica da CCD das substâncias dissolvidas no seu solvente. As sílicas ficaram retidas nos filtros sinterizados e os eluatos foram coletados em frascos previamente tarados. Os frascos com as amostras foram levados à secura resultando em dois isolados (44mg e 32mg, respectivamente). Os isolados dissolvidos em metanol deuterado foram submetidos a espectrofotômetro de RMN Bruker® Avance III 600 MHz.

3.4 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

3.4.1 Preparo do Teste

As placas de Petri (9,0 cm de diâmetro) contendo papel filtro Whatman nº. 1,0, previamente autoclavados a 120°C por 20 minutos, receberam 5,0 mL da solução das amostras (extratos e frações), preparadas nas concentrações de 250 µg/mL, 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Adicionou-se 200 µL de DMSO e 1 mL de MÊS. Em seguida, foram semeadas aleatoriamente sobre cada disco de papel filtro, 30 diásporos da espécie alvo (alface, cebola), distribuídos aleatoriamente, com quatro repetições para cada solução, conforme Brasil (2009). Como controle, procedimento similar foi utilizado, porém com ausência dos extratos e frações.

As placas de Petri contendo os diásporos foram levadas a uma câmara de germinação (BOD), umidade relativa ($\pm 80\%$) e temperatura constante, adequadas a cada espécie alvo, conforme Brasil (2009) (alface, 20°C no escuro; e cebola 15°C, com foto período de 12h; $\pm 2^\circ\text{C}$).

3.4.2 Teste de Germinação

Para os bioensaios de germinação, foi aplicado a metodologia de Macias et al. (2000). A contagem para avaliar a germinação foi realizada diariamente, por 7 dias, tendo como critério a protrusão radicular com no mínimo 2,0 mm de comprimento. O experimento foi considerado concluído quando a germinação foi nula por três dias consecutivos.

O índice de velocidade de germinação (IVG) foi calculado segundo Maguire (1962) para cada repetição de cada tratamento, utilizando-se a quantidade de sementes germinadas, dividindo-se pelo número de dias da germinação e somando-se até o último dia de germinação. Os índices de velocidade de germinação foram submetidos ao ANOVA seguido do teste de Tukey.

3.4.3 Teste de Crescimento

Para os bioensaios de crescimento utilizou-se a metodologia descrita por Barnes et al. (1987) e Macias et al. (2000). Após sete dias da protrusão radicular, mediu-se o alongamento da raiz e do hipocótilo/coleótilo (dez plântulas por placa)

utilizando papel milimetrado. Os resultados das leituras de crescimento foram submetidos a ANOVA seguido de teste de Tukey, para comparação das médias.

3.5 ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O MOSQUITO *Aedes aegypti*

A atividade larvicida sobre *Aedes aegypti* da mistura afrormosina e fujikinetina, isolados da fração clorofórmica da casca da *D. brasiliensis*, foi realizada segundo metodologia do World Health Organization (1981) com algumas modificações.

Os ovos de *A. aegypti* da linhagem Rockefeller foram fornecidos pela Fundação Oswaldo Cruz - RJ; sendo utilizada como padrão de susceptibilidade a inseticida para a espécie *A. aegypti*. (HARTBERG; CRAIG, 1970). Para a eclosão dos ovos, estes foram colocados em bandeja de plástico e adicionados 500 ml de água sem cloro, e em seguida levada para estufa BOD (marca Novatecnica modelo NT 704) com temperatura a 27 °C e umidade relativa de 80%. A dieta das larvas consistiu de ração de peixe (aldon basic, MEP 200 complex) do período de eclosão até o 3º estágio larval.

Foi preparada uma solução de concentração de 1.000 µg/ml da amostra solubilizado com 0,5% de dimetilsulfóxido (DMSO) e diluída com água sem cloro em concentrações distintas de 1.000, 500, 250 e 125 µg/ml.

Foram colocadas 15 larvas do 3º estágio em copo de plástico contendo as amostras e o volume foi completado para 5 ml. Para cada concentração foram usadas 45 larvas em triplicata. Solução aquosa de DMSO 0,5% foi utilizada em triplicata como controle negativo.

A atividade larvicida foi avaliada após 24 horas por meio da contagem do número de larvas mortas em cada amostra. Larvas moribundas, incapazes de atingir a superfície da água quando tocadas, foram consideradas como mortas. (WHO, 1981). Os valores da concentração letal (CL₅₀ e CL₉₀) em µg/ml foram determinados utilizando o método de análise Probit. (FINNEY, 1971). As médias de mortalidade obtidas foram submetidas ao teste de Tukey.

O resultado obtido da atividade larvicida da mistura dos flavonoides foi analisado levando-se em conta os resultados dos extratos e frações da *D. brasiliensis*, testados anteriormente por Dalarmi et al. (2015b). Os dados foram

submetidos à análise de variância (ANOVA) e ao teste de Tukey ($p < 0,05$) para comparação das médias.

3.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A metodologia empregada foi a do método de concentração inibitória mínima (CIM). Uma coleção de dez microrganismos foi utilizada incluindo 8 bactérias: *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538P), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus saprophyticus* (ATCC 15305), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352), *Bacillus subtilis* (ATCC 23856), *Shigella sonnei* (ATCC 25931), e 4 fungos: *Candida albicans* (ATCC 14053), *Candida tropicalis* (ATCC 28707), *Saccharomyces cerevisiae* (ATCC 36375); *Cryptococcus neoformans* (ATCC 90112) e os antibióticos cloranfenicol e nistatina foram utilizados como padrões.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em placas de 96 poços de cultura usando o método de microdiluição e usando uma suspensão de microrganismos com uma densidade de 10^5 UFC/mL com caldo de caseína-soja, incubado por 24 horas a 37°C para bactérias. Para fungos foi utilizado caldo Sabouraud, com um período de incubação de 72 horas a 25°C. As culturas que não apresentaram crescimento foram usadas para inocular placas de meio sólido (Agar Muller Hinton e Agar Soubouraud) com o objetivo de determinar a concentração mínima letal (CML).

As concentrações testadas foram: 1000, 950, 900, 850, 800, 750, 700, 650, 600, 550, 500, 450, 400, 350, 300, 250, 200, 150, 100, 50, 25, 12,5 µg/mL. As amostras foram dissolvidas em DMSO 0,1%. Os padrões, extratos brutos, frações e a mistura afrormosina e fujikinetina, foram ensaiadas simultaneamente, em triplicata, conforme técnica descrita previamente. (HAMMER et. al., 1999; NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1997).

Os valores obtidos das CIMs foram classificados em bom potencial inibitório (até 100 µg/mL); moderada atividade inibitória (entre 100-500 µg/mL); fraca atividade inibitória (entre 500-1000 µg/mL) e inativa (maiores que 1000 µg/mL). (HOLETZ et al., 2002; TANAKA et al., 2005; AYRES et al., 2008).

3.7 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

Nos ensaios de atividade antineoplásica, todo o manuseio das células foi realizado segundo Freshney (1994). Nos ensaios, foi utilizado o método da SRB (sulforodamina B) descrito por Skehan et al. (1990), com utilização de microscópio invertido da ZEISS (Modelo Axiovert 25) em aumento de 400 X para a observação do crescimento das células.

A inibição do crescimento celular, um indicador da citotoxicidade, foi avaliado nos extratos brutos, frações e na mistura afrormosina e fujikinetina, dissolvidas em DMSO 0,1% nas concentrações de 0,25, 2,5, 25; 50; 75; 100; 125; 150; 175; 200; 225; 250 µg/ml.

Para os testes, foram utilizadas células neoplásicas da linhagem U251 (glioma, SNC); NCI-ADR/RES (ovário, com fenótipo de resistência a múltiplas drogas); 786-0 (rim); OVCAR-3 (ovário); HT-29 (cólon), cedidas pelo Prof. Dr. João Ernesto de Carvalho - CPQBA/ UNICAMP (Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas em Campinas – SP), para a realização dos experimentos.

As células foram cultivadas em frascos estéreis na presença de meio de cultura, RPMI 1640, contendo 10 % de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, 0,1 mg/mL de estreptomicina e 0,25 µg/mL de anfotericina (meio completo) e mantidas a 37 °C em incubadora com atmosfera úmida e contendo CO₂ (5%). Uma vez que estas células são aderentes, foi necessário fazer a remoção com a solução de tripsina (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. Em seguida, foram transferidas para tubos cônicos contendo o meio de cultura. Após centrifugação a baixa rotação, o meio e a tripsina foram desprezados e as células ressuspensas em pequeno volume de meio de cultura, e feito a contagem com uma alíquota dessas células em câmara de Neubauer onde em cada cavidade da placa de 96 poços foi depositado um volume de 100 µL de meio contendo 10.000 células (100.000/mL).

Após 20 horas, para permitir a fixação das células semeadas, o meio foi aspirado e as concentrações dos extratos e frações foram adicionadas. Foram adicionados as amostras nas diferentes concentrações em triplicata. No controle negativo, as células foram crescidas na ausência da amostra e contendo somente meio de cultura com DMSO 0,5%. Utilizou-se um controle positivo, a Doxorubicina

(Sigma). Todas as placas foram mantidas na mesma incubadora a 37°C, até o final do período de exposição das células aos compostos-teste (48 h).

O teste adotado baseia-se na coloração das proteínas, pelo corante sulforodamina B (SRB, Sigma). Este corante possui dois grupos sulfônicos, e liga-se às proteínas das células fixadas na placa, cujas proteínas são precipitadas pelo ácido tricloro acético (TCA – Sigma). E deste modo, em 48 horas o meio foi removido e substituído por 100 µL de TCA 20%. As placas foram então incubadas por meia hora em geladeira, e posteriormente, a solução TCA foi removida e as placas lavadas 5 vezes com água corrente. Em seguida foram adicionados 50 µL de SRB 0,1% (diluída em ácido acético 1%) e novamente incubada por meia hora em temperatura ambiente. Após a remoção da solução de SRB, as placas foram lavadas 4 vezes com ácido acético 1%, secas e adicionado Tris Base 10mM (Sigma). Em seguida foram submetidas a uma agitação de 10 minutos para a dissolução das proteínas coradas e a absorbância medida a 540 nm em leitor de microplacas.

A concentração que inibe 50% do crescimento celular (IC_{50}) foi determinada graficamente em programa para gráficos e análises de dados (Microcal Origin Versão 6.0) e Microsoft Office Excel 2007. Extratos que apresentam $IC_{50} \leq 30\mu\text{g/mL}$ são considerados ativos. (ITARATH et al., 2004).

3.8 ESTUDO FARMACOLÓGICO

Os modelos experimentais utilizados visam à avaliação do potencial antinociceptivo, anti-inflamatório e tóxico do extrato bruto etanólico das folhas, e a investigação da atividade gastroprotetora dos extratos brutos etanólico das folhas, cascas e isolados da espécie *D. brasiliensis*.

As abordagens farmacológicas foram realizadas utilizando modelos animais em camundongos Swiss (18-35 g) machos para avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatório e fêmeas na avaliação gastroprotetora e toxicológica. Os animais foram obtidos no biotério da UFPR e biotério da PUC/PR. Os camundongos foram mantidos em temperatura controlada de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em ciclo de 12h claro e 12h escuro e com água e ração a vontade. A administração do extrato e do veículo (soro fisiológico) nos animais foi realizada por gavagem. Cada

ensaio farmacológico foi composto por grupo controle e pelos grupos que receberam as doses do extrato (1 a 3, dependendo do ensaio). Foram utilizados 5 a 8 animais em cada grupo. Ao início do experimento, os animais foram distribuídos homogeneamente entre os grupos experimentais e mantidos no laboratório para aclimação por pelo menos 1 hora antes da realização do experimento. Na avaliação da atividade gastroprotetora e toxicológica os animais ficaram 12h em jejum antes do experimento.

Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com as normas éticas para o estudo de dor com animais de laboratório. (ZIMMERMANN, 1983). O projeto da pesquisa obteve aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais UFPR (CEUA) com número 794 (ANEXO 2).

3.8.1 Avaliação da Atividade Gastroprotetora

3.8.1.1 Lesão gástrica aguda induzida por etanol

Os camundongos foram mantidos em jejum por 12h com acesso livre a água. Grupos de 6 animais receberam tratamento por via oral (v.o.) do veículo (soro fisiológico + Tween® 80 0,5%, 10ml/kg – controle negativo), carbenoxolona 200 mg/kg (padrão - controle positivo) ou EB das folhas ou cascas ou isolados.

Realizou-se o experimento utilizando o extrato etanólico bruto (EB) das folhas e cascas nas doses 10, 30 e 100 mg/kg. Uma vez que o EB das cascas apresentou resultados significativos, este foi testado na dose de 1 e 3 mg/kg, com objetivo de encontrar a menor dose efetiva.

O experimento também foi realizado com substâncias isoladas da casca da espécie; (L1) mistura de esteroides isolados da fração hexano: colesterol, β sitosterol, estigmasterol, campesterol e stigmata 22-25-dien-3-ol; (L2) mistura de afrormosina e fujikinetina, isolados da fração clorofórmio; e o (L3) Kaempferol-6-C-glucosídeo, isolado da fração acetato de etila. Suas doses foram calculadas de acordo com o rendimento destes em relação à fração e a dose efetiva em promover gastroproteção do extrato.

Uma hora após o tratamento, foi administrado 1 ml de etanol 60% + HCl 0,3M e após mais uma hora os animais foram eutanasiados e os estômagos retirados para mensuração da área lesada. (MIZUI; DOTEUCHI, 1983; ROBERT, 1979).

Os estômagos foram fotografados e as imagens obtidas foram analisadas em software de análise de imagens EARP® possibilitando a obtenção da área total de lesão (mm²) para cada grupo, com este dado, foi possível calcular a redução de lesão em porcentagem, considerando o controle negativo como 100% de lesão.

3.8.1.2 Lesões gástricas induzidas por indometacina

A dose que apresentou resultado mais significativo nas lesões induzidas por etanol, EB da casca 10 mg/kg, foi avaliada em lesões induzidas por um anti-inflamatório não esteroide, a indometacina (80 mg/kg).

Os animais foram mantidos em jejum por 12 horas com acesso livre a água. Grupos de 6 animais foram tratados por v.o. com veículo (soro fisiológico + tween® 80 0,5%, 10 mL/kg- controle negativo), carbenoxolona 200 mg/kg (controle positivo) e o EB 10 mg/kg. Uma hora após os tratamentos, foi administrada a indometacina 80 mg/kg v.o., e após seis horas os animais foram eutanasiados, os estômagos retirados e abertos pela curvatura maior para mensuração da área lesada. (MORIMOTO et al., 1991). As lesões foram quantificadas medindo a área total ulcerada de cada estômago em mm² pelo programa EARP®. (BERTE, 2014).

3.8.1.3 Avaliação de mecanismo envolvido na ação cicatrizante gástrica

Amostras teciduais de úlcera induzida por etanol foram pesadas e homogeneizadas com tampão fosfato 200 mM (pH 6,5). Este homogenato foi utilizado para as análises de quantificação do muco gástrico, de grupos sulfídricos não proteicos (GSH), hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e atividade da enzima mieloperoxidase (MPO).

3.8.1.3.1 Quantificação do muco gástrico

Após a avaliação das lesões induzidas por etanol, as regiões do fundo e do antro do estômago foram descartadas e a parte glandular (corpo) foi dividida em duas partes, uma delas foi utilizada para determinação da quantidade de muco. (CORNE et al., 1974).

Esta parte da mucosa gástrica glandular foi pesada e incubada em 4 ml de solução de Alcian Blue 0,1% preparada em uma solução de sacarose 0,16 mM e

acetato de sódio 50 mM (pH 5), onde permaneceu corando por 2 horas em temperatura ambiente. O excesso de Alcian Blue foi removido através de duas lavagens sucessivas com sacarose 250 mM, a primeira por 15 minutos e a segunda durante 45 minutos. O conteúdo de corante então complexado com o muco da parede glandular foi extraído com cloreto de magnésio 500 mM, agitando-se intermitentemente cada segmento por 1 minuto a cada 30 minutos durante 2 horas. Após esse período, 3 ml da solução sobrenadante azul foi misturada com 3 ml de éter dietílico e agitado vigorosamente até a formação de uma emulsão. Essa emulsão foi centrifugada por 10 minutos a 3.600 rpm para a separação da fase aquosa, descartando o resíduo. A partir da fase aquosa obtida foi feita a leitura espectrofotométrica em 598 nm. A quantidade de Alcian Blue ligado ao muco foi determinada por interpolação em uma curva padrão de Alcian Blue (6,25–100 µg), e os resultados foram expressos em µg de Alcian Blue/g de tecido.

3.8.1.3.2 Quantificação de grupos sulfidrílicos não proteicos (GSH)

Parte da região glandular do estômago submetida à lesão por etanol foi utilizada para verificar o efeito protetor dos isolados da espécie na mucosa gástrica pela determinação dos níveis de glutathiona (GSH). Os níveis de GSH na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Sedlak e Lindsay (1968).

Após o tecido lesado ser pesado e homogeneizado em tampão fosfato de potássio 200 mM, foi separado 50 µl deste homogenato e adicionado 40 µl de ácido tricloroacético (ATC) 12,5%. Os tubos foram agitados em um agitador de tubos (Vortex) e centrifugados por 15 minutos a 3.000 rpm. Posteriormente, alíquotas de 10 µl do sobrenadante foram adicionadas a 290 µl de tampão TRIS 0,4 M (pH 8,9) em placa de 96 poços. A reação foi iniciada com a adição de 5 µl de DTNB (5,5'-ditiobis 2-ácido nitrobenzólico) 1 mM, 5 minutos antes da leitura espectrofotométrica que foi feita em comprimento de onda de 415 nm. Os procedimentos foram realizados a 4 °C e os valores individuais interpolados em uma curva padrão de GSH (0,375–3 µg), com os valores expressos em µg de GSH/g de tecido.

3.8.1.3.3 Determinação dos níveis da mieloperoxidase (MPO)

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de leucócitos polimorfonuclear que migram para o local do estímulo inflamatório. O princípio do método baseia-se na liberação de MPO para o tecido lesado. A determinação dos níveis de MPO foi realizada de acordo com a técnica descrita por Hillegass et al. (1990).

Após a análise da lesão, os estômagos foram pesados e homogeneizados em 0,6 ml de tampão fosfato 200 mM pH 6,5. O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm para determinação dos níveis enzimáticos da MPO. O precipitado obtido foi ressuspendido com 1 ml de tampão fosfato de potássio 80 mM na presença de 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (HTAB). Após a homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 4.000 rpm por 20 minutos a 4 °C. Em placas de 96 poços foi adicionado, em triplicata, 30 µl do sobrenadante, acrescido de 220 µl de uma solução contendo: 100 µl de tampão fosfato 80 mM, 85 µl de tampão fosfato 22 mM e 15 µl de H₂O₂ 0,017%. A reação foi iniciada com adição de 20 µl de tetrametilbenzidina (TMB). Em seguida, a amostra foi incubada por 3 minutos a 37°C e a reação interrompida pela adição de 30 µL de acetato de sódio 1,46 M (pH = 3,0). Os níveis enzimáticos foram determinados por espectrofotômetro a 620 nm. Os resultados foram expressos como unidade de densidade óptica (D.O.)/mg de proteína.

3.8.1.3.4 Determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Após a análise da lesão, os estômagos foram pesados e homogeneizados em 0,6 ml de tampão fosfato 200 mM pH 6,5. O homogenato foi centrifugado por 20 minutos a 3.000 rpm para determinação de hidroperóxidos lipídicos (LOOH). O total de LOOH na mucosa gástrica foi mensurado conforme metodologia de Jiang et al. (1991).

Em tubos de microcentrífuga foram adicionados 10 µL de metanol e 100 µL do homogenato, posteriormente agitou-se os tubos em vórtex e centrifugou-se a 11.000 rpm 20 minutos a 4 °C em ultracentrífuga. Em placa de 96 poços foram colocados 30 µL do sobrenadante e 140 µL de meio reacional (Xilenol laranja, Ferro II e

hidroxitolueno butilado solubilizados em metanol) incubado por 30 minutos a temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 560 nm e, a concentração de LOOH foi determinada para cada 1 mg de tecido. Desta maneira, os resultados foram apresentados como mmol/mg de tecido.

3.8.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória

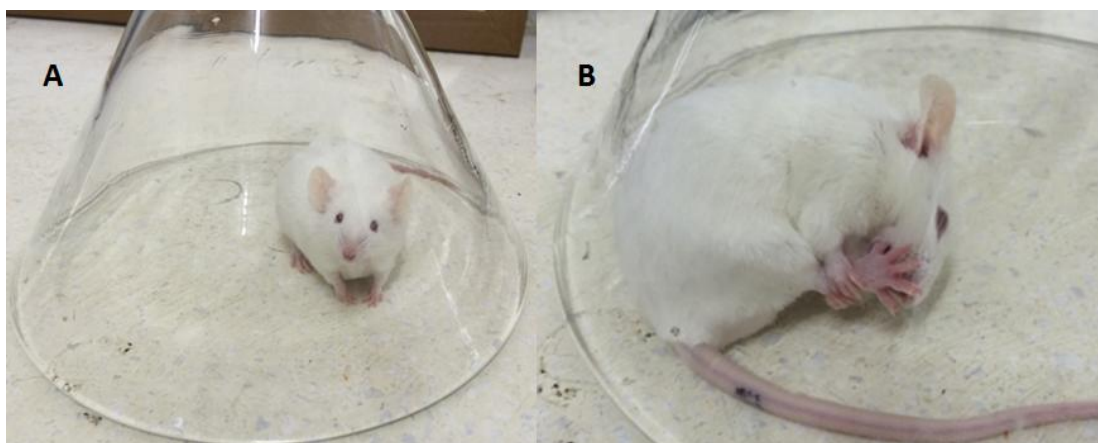
3.8.2.1 Nocicepção induzida por formalina

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992).

O experimento foi executado conforme metodologia descrita por Hunskaar et al. (1985), a qual consiste na injeção de 20 µL de uma solução de formalina a 2,5% (0,92% de formaldeído) na superfície ventral da pata posterior direita. O indicativo de nocicepção é o tempo que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata injetada, conforme ilustrado na FIGURA 7, durante os primeiros cinco minutos após a injeção (primeira fase ou fase neurogênica), e durante o intervalo de 15 a 30 minutos após a injeção (segunda fase ou fase inflamatória).

Com objetivo de encontrar uma dose efetiva para o extrato, inicialmente, os animais foram pré-tratados com o EB da folha na dose 10, 30 e 100 mg/kg, e posteriormente, dose 300, 600 e 900 mg/kg, v.o., 1 hora antes da injeção intraplantar de formalina. Os animais foram observados em relação ao tempo de resposta nociceptiva durante as duas fases do modelo.

FIGURA 7 - FOTOGRAFIA DE CAMUNDONGO NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA



FONTE: O autor (2016)

NOTA: A: Animal observado dentro de cone de vidro B: Visualização do animal lambendo a pata injetada

3.8.2.2 Nocicepção induzida por ácido acético

O teste de nocicepção induzida por ácido acético foi executado conforme metodologia adaptada de Koster et al. (1959), a qual consiste na injeção intraperitoneal de 450 μ L de uma solução de ácido acético a 0,6%. O indicativo de nocicepção foi o número de contrações da musculatura abdominal, associadas ao alongamento dos membros posteriores, durante o período de 20 minutos (FIGURA 8). Os animais foram pré-tratados com os EB folha, dose 300, 600 e 900 mg/kg, v.o., 1 hora antes da injeção intraperitoneal de ácido acético, e observados com relação ao número de contorções abdominais durante o período de avaliação.

FIGURA 8 - FOTOGRAFIA DE CAMUNDONGO SOB EFEITO DA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO: CONTRAÇÃO DA MUSCULATURA ABDOMINAL COM ALONGAMENTO DE MEMBROS INFERIORES



FONTE: O autor (2016)

3.8.2.3 Avaliação do edema da pata induzido pela carragenina

Para verificar o efeito anti-inflamatório do EB foi utilizado o modelo de edema de pata induzido pela carragenina conforme metodologia de Di Rosa e Willoughby (1971) com modificações. Este modelo consiste na verificação da altura e espessura da pata posterior do animal, na parte imediatamente proximal dos dedos (FIGURA 9), depois da injeção intraplantar de uma solução de carragenina a 2%.

Os animais foram pré-tratados com o veículo e com EB, dose 600 e 900 mg/kg por v.o., 1 hora antes da injeção de 20µl de carragenina na pata direita. Como controle, na pata esquerda foi injetado 20 µl de soro fisiológico. As medidas foram feitas utilizando um paquímetro digital nos tempos de 1,2,3,4 e 24 horas após a injeção da solução de carragenina.

FIGURA 9 - MENSURAÇÃO DO EDEMA DE PATA



FONTE: O autor (2016)

3.8.3 Toxicidade Crônica

Para avaliar possíveis efeitos tóxicos após administração crônica do extrato das folhas da espécie, foi utilizada metodologia descrita por Montrucchio (2012), onde os animais foram tratados com veículo (soro fisiológico + Tween® 80 0,5% - controle negativo) ou com o EB folha (900 e 2000 mg/ml), v.o., uma vez ao dia, durante 21 dias. Os animais foram observados diariamente e pesados no 1º, 7º, 14º e 21º para a avaliação de perda ou ganho de peso. No primeiro dia e após a última administração (21º dia) de tratamento, os animais foram submetidos a dois testes

para avaliação da atividade motora, o teste do campo aberto e o teste da natação forçada. Estes testes, além de verificar se a administração crônica do extrato afeta a atividade locomotora, contribuíram para avaliar se a atividade antinociceptiva seria decorrente de efeitos inespecíficos.

Após jejum de 12 horas, no 22º dia os animais foram anestesiados com cetamina (50 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) para a coleta de 1 mL de sangue. Em seguida eles foram sacrificados e os órgãos vitais – coração, pulmões, fígado, baço, estômago, rins e cérebro – foram retirados e pesados em relação ao peso corporal. Estes órgãos foram excisados, fixados e armazenados para posterior análise histológica.

O sangue coletado foi dividido em alíquotas, um pequeno volume foi transferido para um tubo com EDTA para as análises hematológicas e o restante da amostra foi transferido para um tubo sem anticoagulante e centrifugado a 3.500 rpm por 10 minutos a 4°C para separação do soro, o qual foi utilizado para a dosagem de enzimas hepáticas: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT); uréia; creatinina K e ácido úrico com kits bioquímicos (Labtest®) em equipamento Labtest®, de acordo com as instruções do fabricante.

3.8.3.1 Avaliação da atividade locomotora

No teste do campo aberto, os animais foram pré-tratados com veículo (controle negativo) ou com o EB (900 e 2000 mg/ml), v.o., e após 1 hora foram colocados no interior de uma caixa de madeira (30x50x50 cm) com o assoalho dividido em 16 quadrados de tamanhos iguais (FIGURA 10). Imediatamente após a colocação do animal na caixa, foi contabilizado o número de quadrados cruzados com as quatro patas, durante o período de seis minutos. (RODRIGUES et al., 2002).

FIGURA 10 - TESTE DO CAMPO ABERTO



FONTE: O autor (2016)

3.8.3.2 Teste da natação forçada

Os grupos de animais foram tratados com o EB folha na dose de 900 e 2000 mg/ml ou veículo (grupo controle negativo) e submetidos ao teste da natação forçada, conforme FIGURA 11, para avaliar uma possível ação antidepressiva.

FIGURA 11 - TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA



FONTE: O autor (2016)

Após o tratamento com EB e veículo, os animais foram colocados individualmente em cubas de vidro (altura: 30 cm e largura: 20 cm

aproximadamente) contendo 20 cm de água (FIGURA 11), por um período de 6 minutos, no qual foi registrado, a partir do segundo minuto, o tempo de imobilidade para cada animal e a latência para apresentação de tal comportamento. Considerou-se imobilidade quando o animal fez movimentos mínimos para manter a cabeça fora da água. (PORSOLT et al., 1990).

Substâncias antidepressivas aumentam a latência para a imobilidade e reduzem o tempo de imobilidade apresentado pelos animais. (PORSOLT et al., 1977; BORSINI; MELI, 1988; SKALISZ, 2004).

3.8.3.3 Análises Histológicas

Cortes transversais do lóbulo direito do fígado, rins e estômagos foram obtidos e fixados no líquido metacan, composto por 60 mL de metanol, 30 mL de clorofórmio e 10 mL de ácido acético glacial, por três horas. Na sequência, o material foi submetido a banhos consecutivos de etanol absoluto por três vezes durante 30 minutos e permaneceu em repouso por 16 horas em temperatura ambiente no etanol absoluto contendo xilol na mesma proporção. Após as 16 horas, o material sofreu diafanização em xilol três vezes consecutivas durante 30 minutos cada. O material foi então impregnado em parafina líquida por duas horas em estufa, sob temperatura de 58 °C. Os blocos histológicos foram submetidos à microtomia, obtendo-se cortes com três micrometros de espessura. As lâminas contendo os cortes histológicos foram desparafinizadas, hidratadas e coradas com hematoxilina de Harris (Merck), por 60 segundos. Após, as lâminas foram lavadas em água corrente com água destilada para posterior coloração com eosina (Merck) durante 1 minuto, segundo Beautler et al. (1995) e Culling et al. (1985). Após a coloração, as lâminas foram lavadas com água destilada, desidratadas em solução crescente de etanol (70 a 100%, durante cinco minutos em cada etapa), diafanizadas primeiramente em álcool e xilol (etapa única de cinco minutos) e após somente em xilol (duas etapas a 100%, durante cinco minutos cada). Ao final da preparação, as lâminas foram avaliadas em microscopia ótica.

As imagens histopatológicas foram obtidas no setor de histopatologia do Hospital das Clínicas- PR, sob orientação do médico patologista prof^o José Ederaldo Queiroz Telles.

3.8.4 Análise Estatística das Atividades Farmacológicas

Os resultados da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva foram apresentados como média \pm erro padrão da média e os dados foram analisados por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida do teste de Tukey. Os dados do experimento edema de pata foram analisados por teste T de Student. Os valores de DI_{50} foram determinados por regressão não-linear e reportados como média geométrica com intervalo de confiança de 95%.

Os resultados da atividade gastroprotetora foram apresentados como média \pm erro padrão da média de $n=6$. Utilizou-se a análise de variância (ANOVA) de uma via, seguida por teste de Bonferroni.

Todas as análises estatísticas foram feitas utilizando o *software* GraphPad Prisma 5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Valores de p menores que 0,05 foram considerados significativos.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

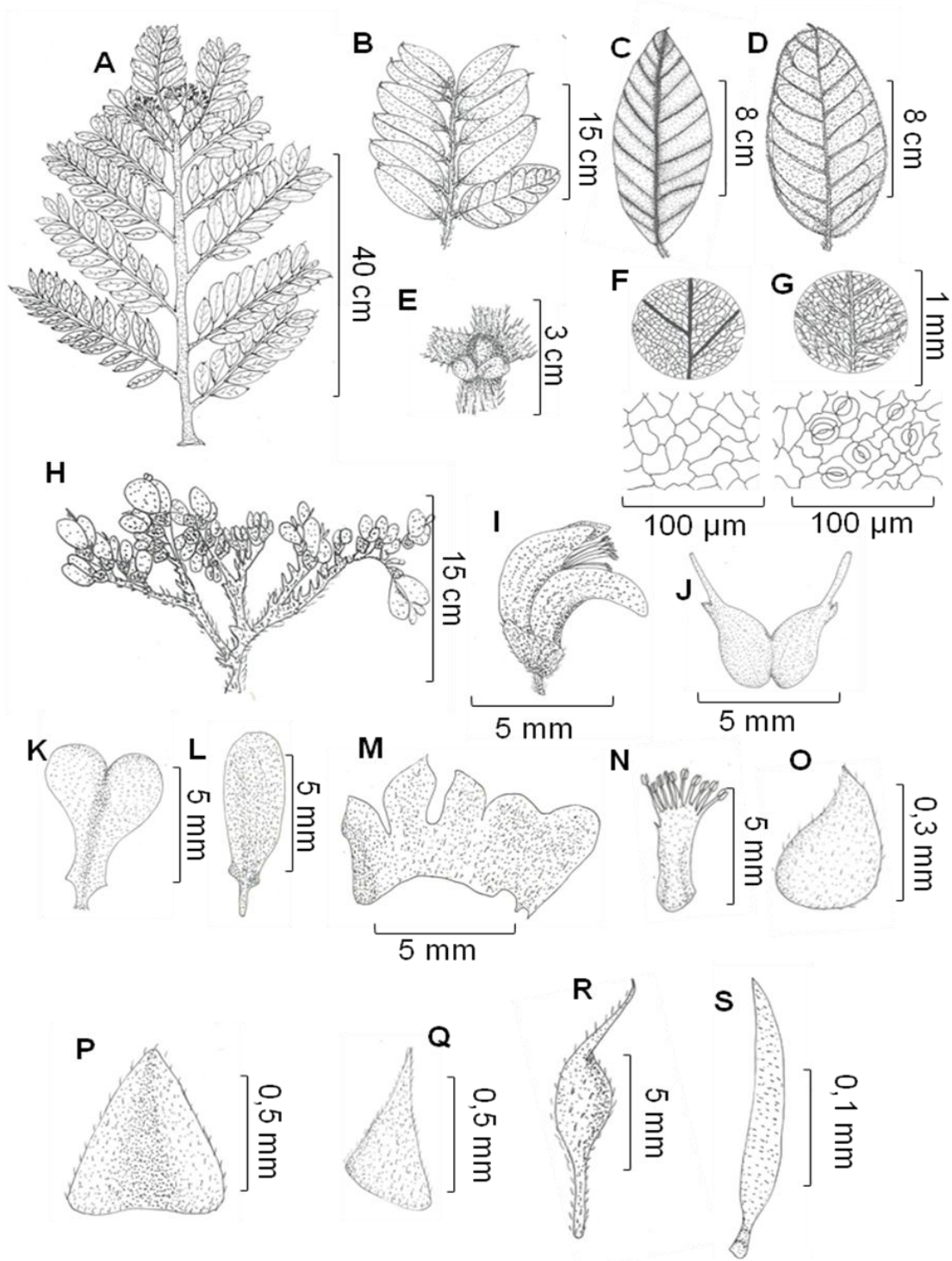
4.1 ESTUDO MORFOANATÔMICO

4.1.1 Análise Morfológica Externa

A espécie *D. brasiliensis* é uma árvore que possui um tronco cilíndrico, reto a levemente tortuoso. Possui copa alta e ampla. A casca externa, com até 11 mm, possui coloração acastanhada, levemente áspera e rugosa e com desprendimento em placas irregulares, com muitas lenticelas horizontais. A casca interna possui coloração amarelada, com textura fibrosa e estrutura laminada. As folhas são compostas, imparipinadas, raque com 12 a 15 cm de comprimento e 13 a 27 pares de folíolos lineares. As flores possuem coloração amarela clara, perfumadas, em inflorescência paniculadas, terminais e nas últimas axilas foliares. A FIGURA 12 ilustra o aspecto morfológico das folhas e flor da espécie.

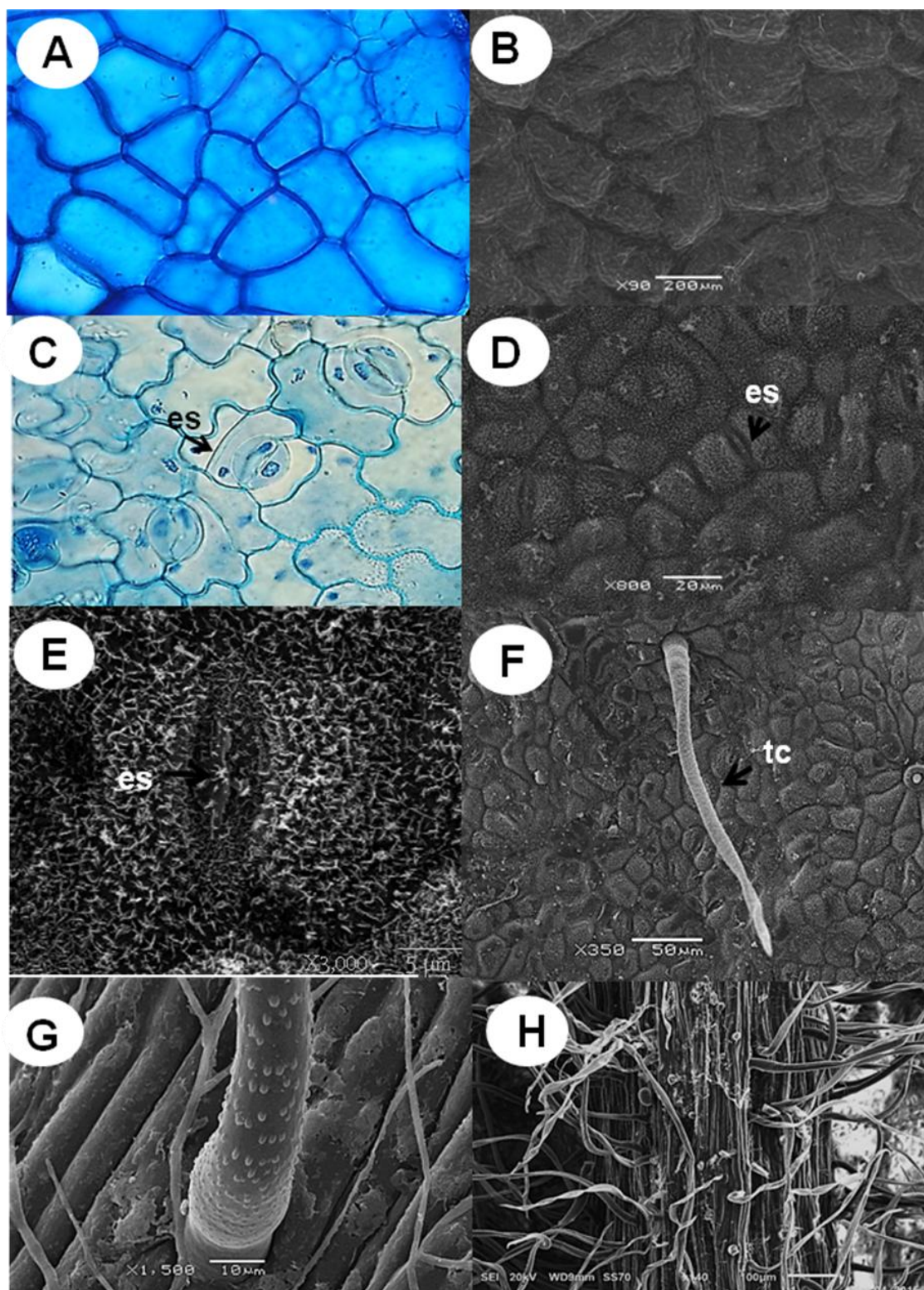
4.1.2 Análise Anatômica

O folíolo, em vista frontal apresenta células epidérmicas com contorno poligonal na face adaxial, sendo observada a presença de uma cutícula com aspecto rugoso a estriado (FIGURA 13- A,B). Na face abaxial é observado que estas células apresentam um contorno angulado, com alguns campos de pontuação, e os estômatos encontram-se um nível abaixo das células subsidiárias. A cutícula é densa em quase toda a extensão na face abaxial, de aspecto levemente sinuoso (FIGURA 13- C,D,F). Tricomas tectores unisseriados e pluricelulares, longos e com paredes contendo estruturas em formato de escamas ocorrem na superfície epidérmica e na nervura da face abaxial. (FIGURA 13- F,G,H). A base dos tricomas tectores possui células relativamente pequenas, com um aspecto rugoso, e a célula apical possui formato alongado com terminação aguda (FIGURA 13- F,G e FIGURA 31- K). Os estômatos são classificados como paracíticos, pois apresentam duas células subsidiárias paralelas às células-guarda (FIGURA 13- C,E), e são restritos à face abaxial da folha, caracterizando-a como hipoestomática, que é característico de espécies localizadas em regiões úmidas.

FIGURA 12 - ASPECTO MORFOLÓGICO DA *D. brasiliensis*

FONTE: O autor (2017)

NOTA- A: Visão geral da folha composta; B: Visão geral folíolo; C, F: Folha, face adaxial, demonstrando a ausência de estômatos; D, G: Folha, face abaxial, demonstrando a presença de estômatos; E: Estipelas; H: Ramo com inflorescências; I: Visão Geral da Flor; J: Peça da quilha; K: Estandarte; L: Asa; M: Cálice; N: Androceu; O: Estípula floral; P: Bráctea; Q: Sépala floral; R: Gineceu; S: Tubo estaminal.

FIGURA 13 - MORFOANATOMIA FOLHA *D. brasiliensis*

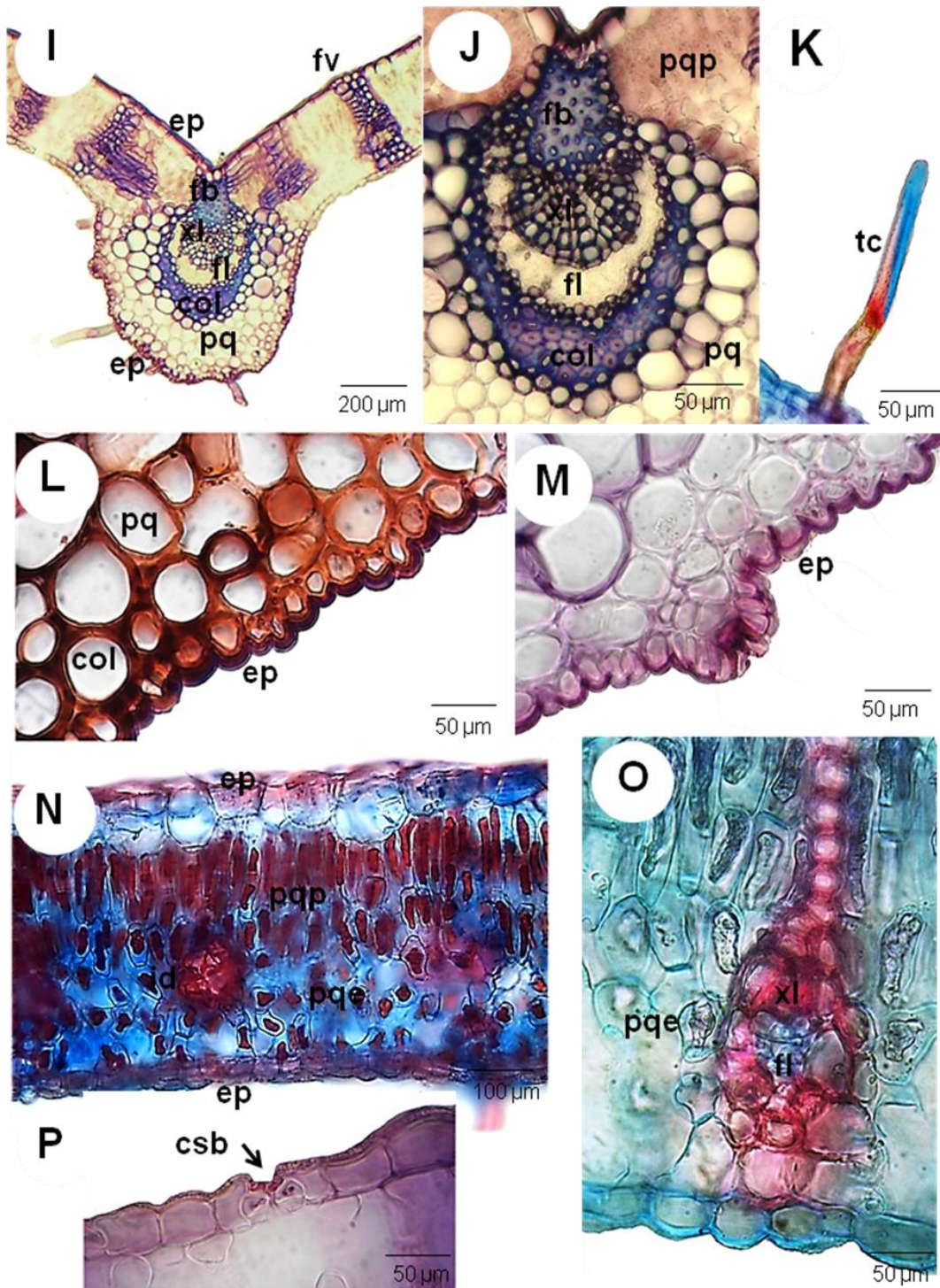
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: A. Secção paradérmia adaxial, B. Secção paradérmia adaxial (MEV), C. Secção paradérmia abaxial, D. Secção paradérmia abaxial (MEV), E. Pormenor de um estômato (MEV), F. Pormenor de um tricoma (MEV), G. Pormenor de um tricoma evidenciando a base. H. Nervura central evidenciando a epiderme e tricomas (MEV). es: estômato, tc: tricoma

Numerosos tricomas tectores são observados na nervura abaxial da folha, sendo que estes possuem entre 0.3 a 0.7 μm (FIGURA 13- H). O feixe vascular da nervura mediana é do tipo colateral, sendo o floema esparsamente interrompido pelo tecido xilemático. O feixe possui formato convexo aberto, com extrato colenquimático de 4-6 camadas adjacente ao parênquima na face abaxial e 6-8 camadas adjacentes à epiderme da face adaxial. A presença de um anel colenquimático circundando o sistema vascular na porção apical e mediana também é observado (FIGURA 14- I,J). A epiderme é unisseriada e apresenta células quadrangulares relativamente maiores na porção adaxial, quando comparadas a porção abaxial (FIGURA 14- I,L). A presença de canais resiníferos foi observada na epiderme adaxial, na região do feixe vascular (FIGURA 14- M).

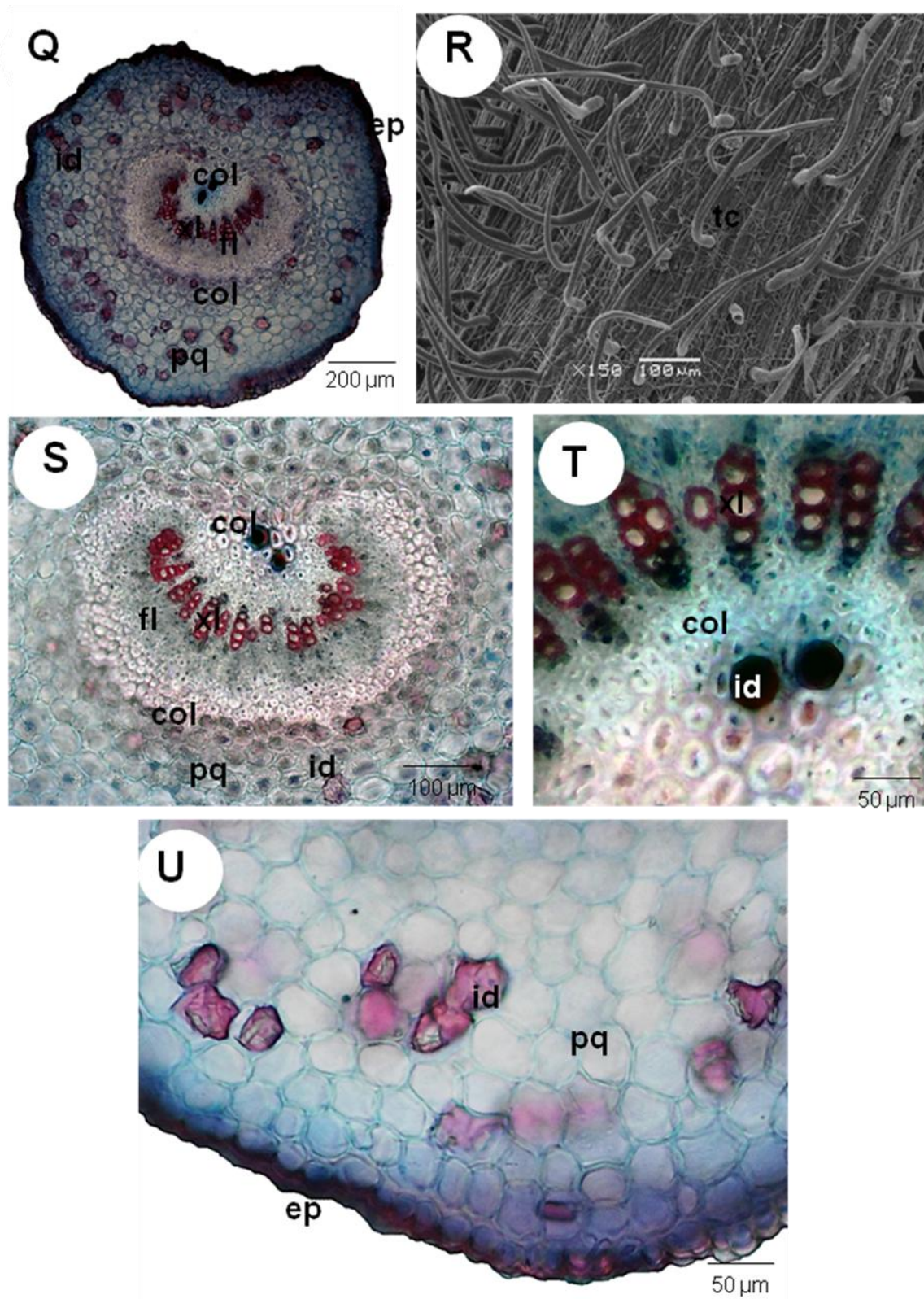
O mesofilo possui organização dorsiventral, sendo constituído de parênquima paliçádico, com 2-3 camadas seriadas na face adaxial e 4-5 camadas de parênquima esponjoso na face abaxial, com bordas levemente rotunda. Alguns feixes vasculares de pequeno porte contendo fibras de colênquima, também podem ser observados. Os feixes de médio porte são concêntricos, com células de xilema circundando todo o floema, onde as células do parênquima paliçádico são esparsamente interrompidas por uma série de células xilemáticas que se deslocam até a epiderme (FIGURA 14- N,O). Os estômatos apresentam células-guarda localizadas no mesmo nível das circunvizinhas (FIGURA 14- P).

Em secção transversal, o pecíolo, possui características um pouco semelhantes ao observado para o feixe da lâmina foliar: presença de um anel colenquimático que circunda o xilema e floema. As células deste colênquima são do tipo anelar, e logo abaixo ocorre tecido de parênquima com vários extratos de células. O pecíolo também possui formato côncavo convexo. Neste feixe é observado várias fileiras de floema, (8-20 camadas), que se intercalam com as células do xilema (3-5 camadas) (FIGURA 15- Q,S,T,U). Numerosos tricomas tectores também são observados tanto na face adaxial quanto abaxial do pecíolo (FIGURA 15- R).

FIGURA 14 - MORFOANATOMIA FOLHA *D. brasiliensis*

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: I. Folha em secção transversal, J. Detalhe da nervura central, K. Detalhe de um tricoma tector, L. Detalhe da epiderme e colênquima, M. Detalhe mostrando estrutura glandular, N. Detalhe da região do mesófilo foliar, O. Detalhe de um feixe vascular da região do mesófilo, P. Estômato em secção transversal demonstrando as células guarda e câmara subestomática. ep: epiderme, fv: feixe vascular, fb: fibras, xl: xilema, fl: floema, col: colênquima, pq: parênquima, pqp: parênquima paliçádico, pqe: parênquima esponjoso, tc: tricoma, csb: câmara subestomática.

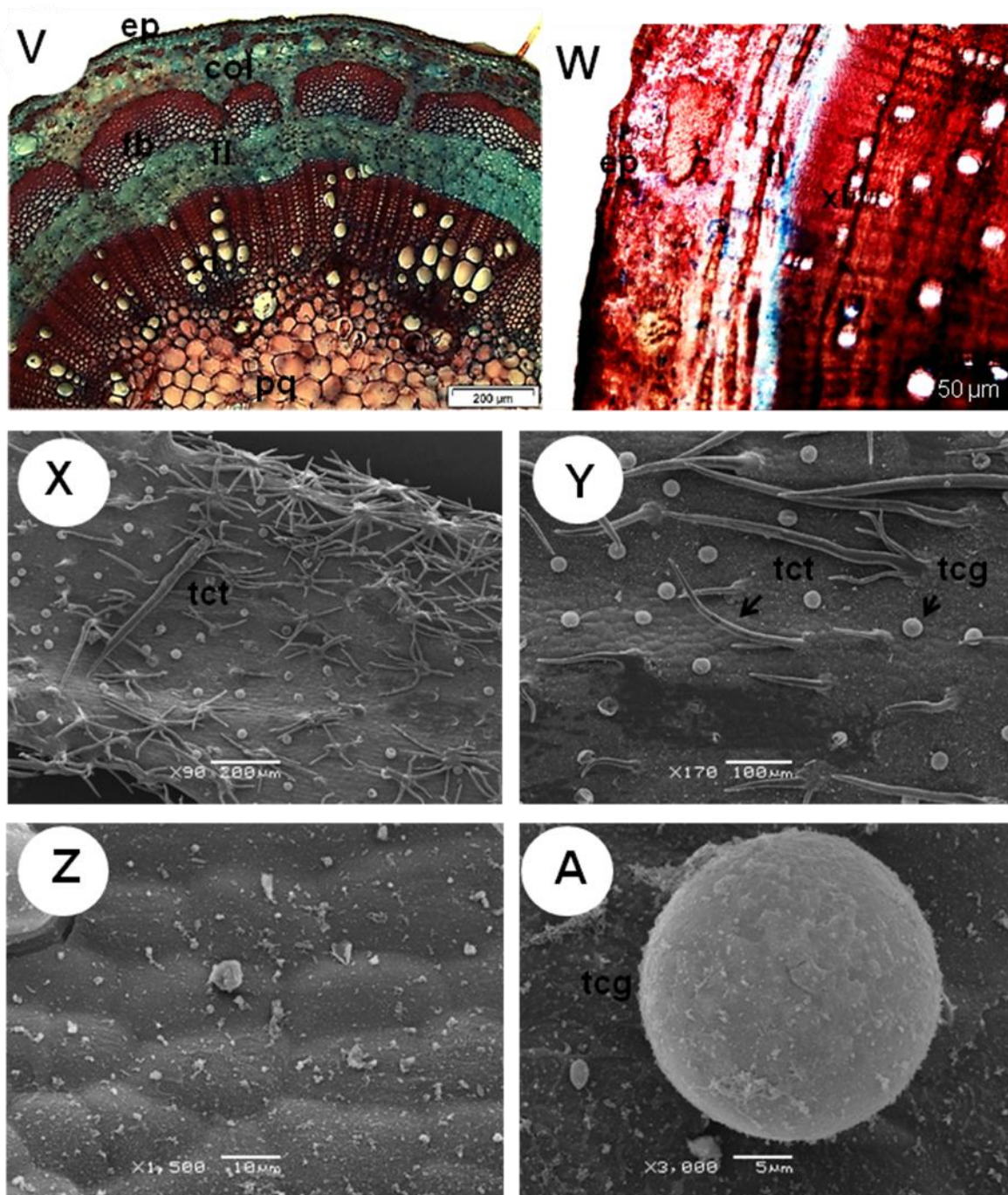
FIGURA 15 - MORFOANATOMIA PECÍOLO *D. brasiliensis*

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Q. Secção transversal do pecíolo demonstrando o arranjo do feixe vascular, R. Tricomas tectores presentes no pecíolo (MEV), S. Detalhe do feixe vascular, T. Fibras de xilema e células de colênquima contendo idioblastos, U. Detalhe do parênquima abaxial demonstrando a presença de idioblastos. ep: epiderme, col: colênquima, fl: floema, pq: parênquima, id: idioblasto.

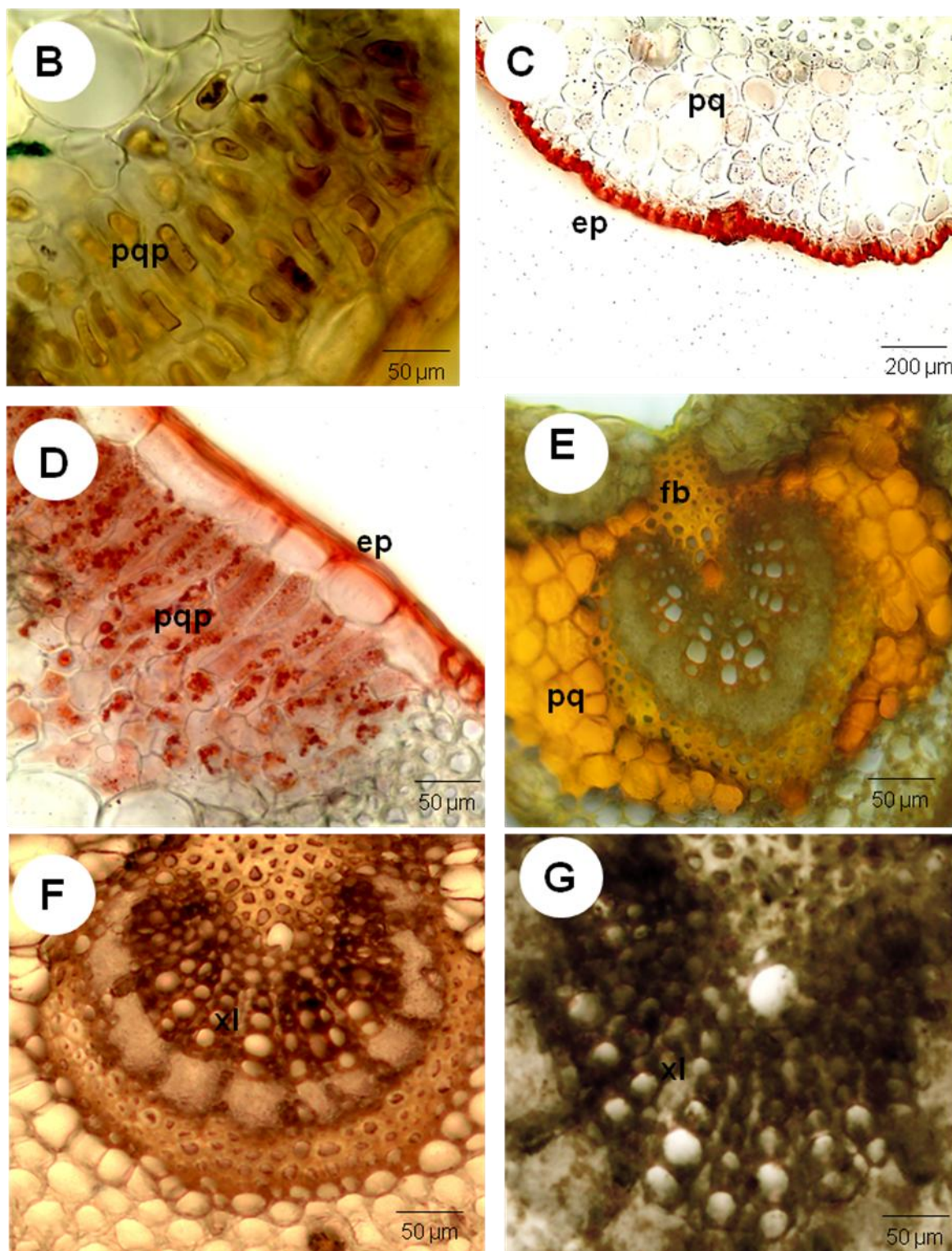
O caule e a casca possuem contorno circular com epiderme unisseriada, em fase de destacamento, sendo revestida por cutícula densa (FIGURA 16- V,W). Foram observados três tipos de tricomas no caule: tectores unisseriados e unicelulares com cerca de 0.5–12 μm ; tricomas estrelados, multicelulares, radiados, com 0.2-0.7 μm , e ainda tricomas glandulares arredondados, com cerca de 0.5-1.3 μm de diâmetro (FIGURA 16- X,Y,Z,A), sendo todos inseridos em depressão epidérmica, com a epiderme contendo uma fina deposição de cera. Na região mais externa (subepidérmica), é observado o felogênio, seguido de súber e feloderme (FIGURA 16- V,W). Abaixo, é observado 4-6 camadas de floema, contendo vários idioblastos. Fibras de esclerênquima circundam o feixe vascular, sendo estes intercalados por colênquima e floema. O floema, externo ao xilema, possui elementos crivados e a presença de poucas células parenquimáticas. O xilema, que é totalmente lignificado, apresenta células parenquimáticas, elementos traqueais e fibras. Raios estreitos percorrem os sistemas vasculares, e estes estão presentes no parênquima cortical, no sistema vascular e na porção mais externa da medula (FIGURA 16- V).

A presença de lipídios totais foi observada na epiderme das folhas, pecíolo e caule, parênquima paliçádico foliar, tricomas tectores do pecíolo, felogênio e idioblastos na região do parênquima do caule (FIGURAS 17- C,D; 18- H,I e 19- N,O). Polissacarídeos neutros foram detectados no parênquima e colênquima da folha (FIGURA 17- E) xilema e epiderme do pecíolo (FIGURA 18- K) e parênquima do caule (FIGURA 19- P). A presença de lignina foi observada no xilema da folha e pecíolo (FIGURAS 17-F e 18- K) e nos raios xilemáticos secundários do caule (FIGURA 19- S). Substâncias fenólicas são observadas no xilema da folha, idioblastos do parênquima e nos raios de xilema e floema do caule e casca (FIGURA 19- T,U,V).

FIGURA 16 - MORFOANATOMIA CAULE *D. brasiliensis*

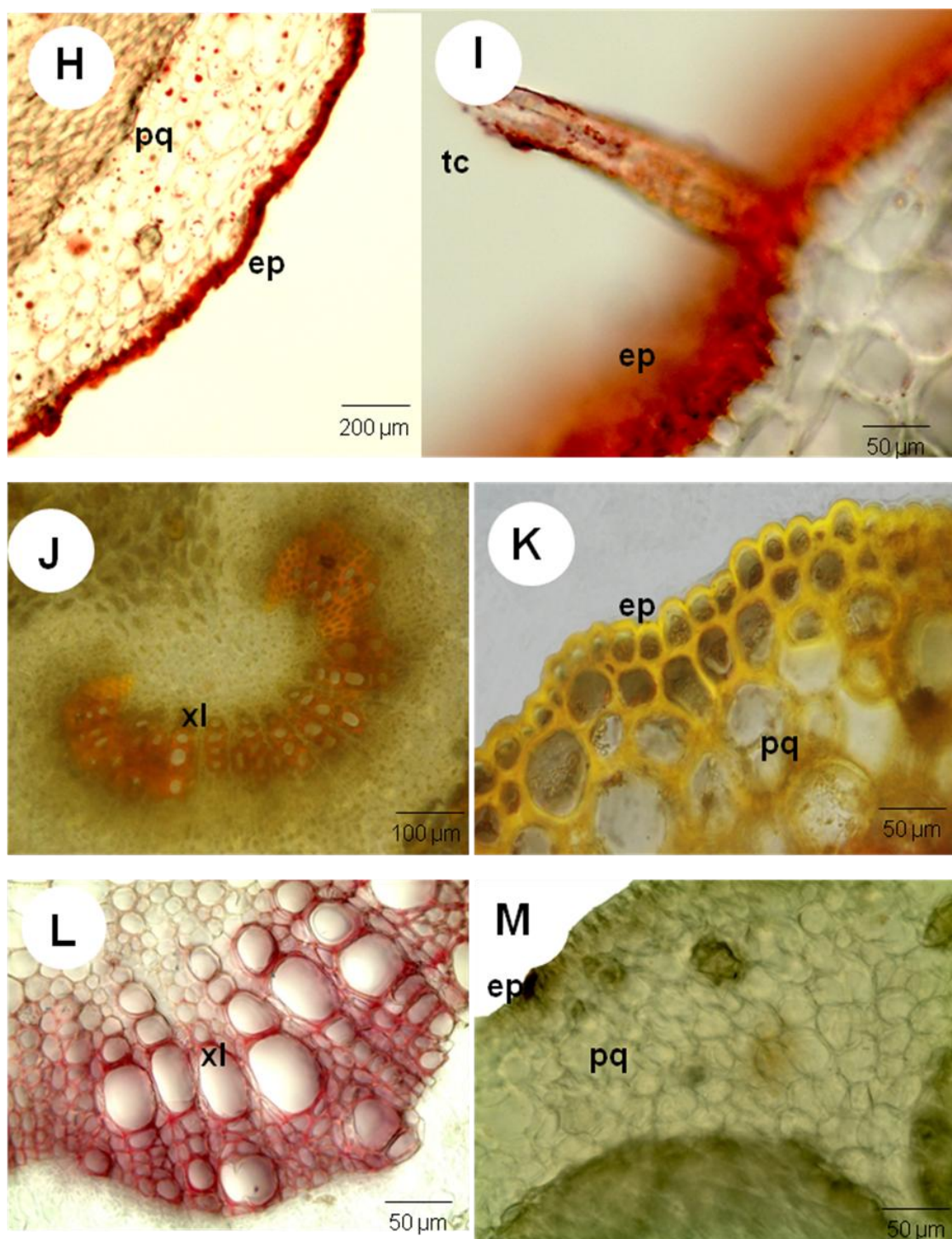
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: V. Detalhe do caule em crescimento primário, W. Detalhe do caule e crescimento secundário, X. Visão geral do caule, Y. Presença de tricomas tectores e glandulares, Z. Detalhe da epiderme com cutícula lisa, A. Tricoma glandular. ep: epiderme, col: colênquima, fl: floema, pq: parênquima, xl: xilema, tct: tricoma tector, tcg: tricoma glandular.

FIGURA 17 - TESTES HISTOQUÍMICOS DA FOLHA DA *D. brasiliensis*

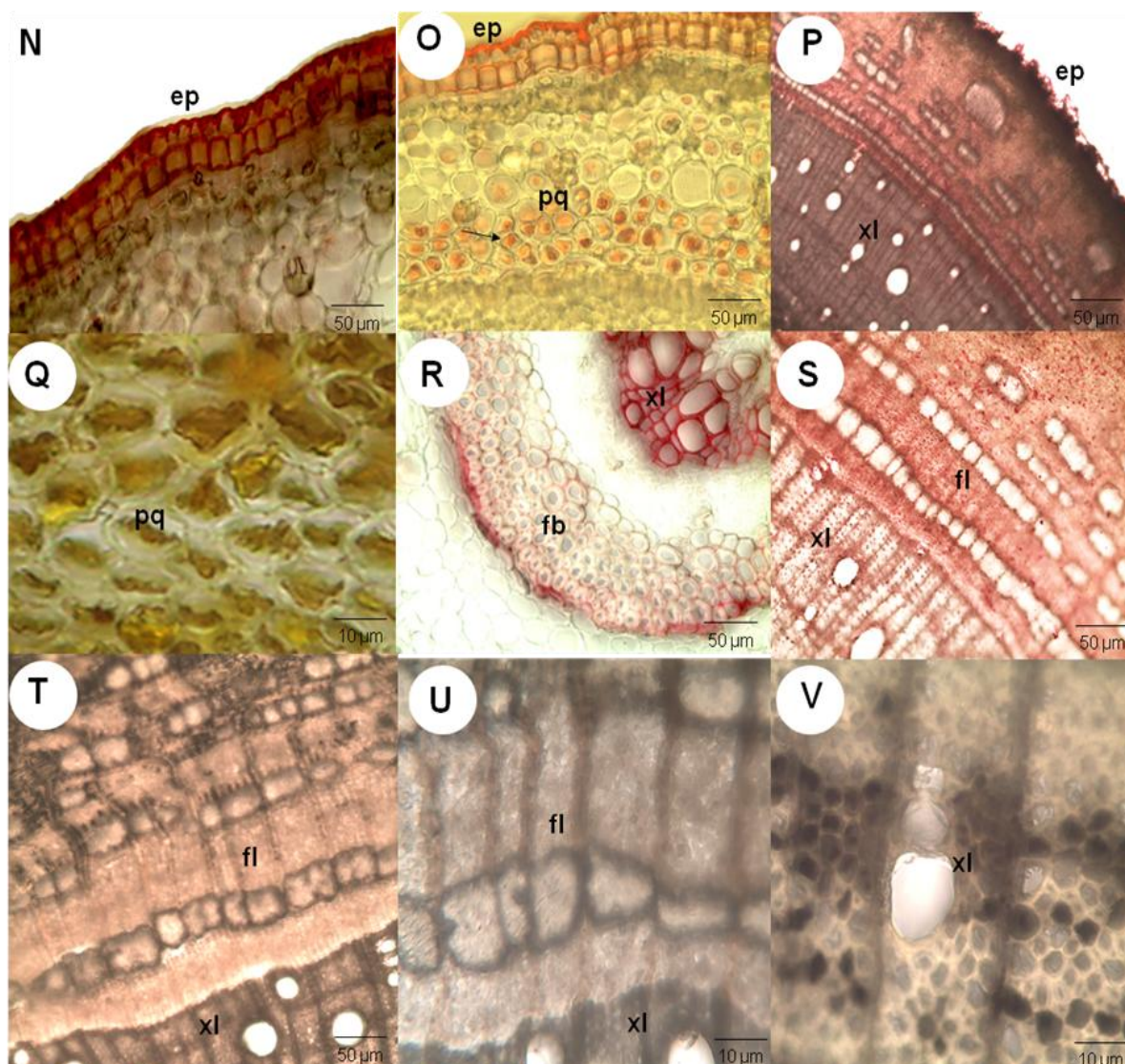
FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Testes histoquímicos evidenciando: B. Presença de amido no parênquima paliçádico, C. Presença de lipídios na epiderme, D. Presença de lipídios no parênquima paliçádico, E. Presença de terpenóides com grupo carbonila no parênquima e colênquima, F. Presença de lignina do xilema, G. Presença de substâncias fenólicas entre os feixes de xilema. ep: epiderme, pq: parênquima, pqp: parênquima paliçádico, fb: fibras, xl: xilema.

FIGURA 18 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO PECÍOLO DA *D. brasiliensis*

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Testes histoquímicos evidenciando: H. Presença de lipídios na epiderme, I. Presença de lipídios no tricoma tector, J. Presença de terpenóides com grupo carbonila no xilema do feixe vascular, K. Na epiderme, L. Presença de lignina do xilema, M. Presença de substâncias fenólicas nos idioblastos do parênquima. ep: epiderme, pq: parênquima, tc: tricoma, xl: xilema.

FIGURA 19 - TESTES HISTOQUÍMICOS DO CAULE DA *D. brasiliensis*

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: Testes histoquímicos evidenciando: N. Presença de lipídios na epiderme e endoderme, O. Presença de lipídios nos idioblastos do parênquima, P. Presença de lipídios no xilema secundário, Q. Presença de terpenóides com grupo carbonila no nos idioblastos presentes no parênquima, R. Presença de lignina do xilema, S. Presença de lignina no xilema secundário, T e U. Presença de substâncias fenólicas entre os feixes de xilema, V. Presença de substâncias fenólicas nas células do colênquima. ep: epiderme, pq: parênquima, xl: xilema, fb: fibras do esclerênquima

Realizar um estudo anatômico e histoquímico de folhas e caules de *D. brasiliensis* para encontrar caracteres distintivos que possam constituir parâmetros para suportar sua taxonomia, bem como controle de qualidade de seus etnofármacos e derivados, torna-se importante dentro do estudo com produtos naturais. Informações gerais sobre a anatomia de *Dalbergia* foram referidas por Metcalfe e Chalk (1950) que relataram a presença de estruturas secretoras produzindo resinas ricas em substâncias bioativas. Khan et al.(2011), registraram a mesma informação sobre marcadores epidérmicos de *D. sisso*. Farooqui et al.(1989) realizaram estudos de caracteres cuticulares de três espécies de *Dalbergia*: *D. emarginata*, *D. latifolia* e *D. sissooides*.

Conforme verificado, a epiderme de *D. brasiliensis* é hipostemática, em vista frontal, apresentando um padrão diferente do descrito por Metcalfe e Chalk (1950) para o gênero *Dalbergia* e por Kahn et al. (2001) para *D. sisso*, que descreveram como folhas anfiestomáticas (com estômatos nas duas superfícies). Farooqui et al. (1989) registraram o tipo anfihipoestomática para três espécies do gênero: *D. latifolia*, *D. sissooides* e *D. sisso*, que possuem predominantemente folhas hipoestomáticas, com estômatos raros na superfície adaxial.

A presença de canais resiníferos são um padrão para algumas espécies do gênero *Dalbergia*, conforme descrito por Farooqui et al. (1989). Canais resiníferos na superfície abaxial também estão presentes em outros gêneros de Fabaceae como *Bauhinia*, de acordo com Metcalfe e Chalk (1950).

Além disso, segundo literatura, o padrão das folhas de *D. brasiliensis*, com várias camadas de parênquima paliçádico e tipo de colênquima são bem característicos para folhas deste gênero. De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), devido à ampla gama de tipos morfológicos, as folhas são consideradas uma estrutura altamente variável em Fabaceae, que apresenta grande plasticidade, mas geralmente é dorsiventral e menos freqüentemente isobilateral. Além disso, o parênquima paliçádico e parênquima esponjoso são tecidos conhecidos por revelar respostas relacionadas à luz, solo e variações nos níveis de água, conforme descrito por Esau (1972), Levitt (1980) e Rozema et al. (1997).

Ao longo de toda a nervura central, a região perivascular é marcada pela presença de um cordão de colênquima contínuo. De acordo com Metcalfe e Chalk (1950), a morfologia do pecíolo sofre pouca influência do ambiente e representa uma

estrutura de importância taxonômica. O padrão do sistema vascular do pecíolo em *D. brasiliensis* também foi relatado para estar presente em outras espécies de Fabaceae, como *Caragana arborescens*, *Erythrina crista-galli*, *Galega officinalis*, entre outros.

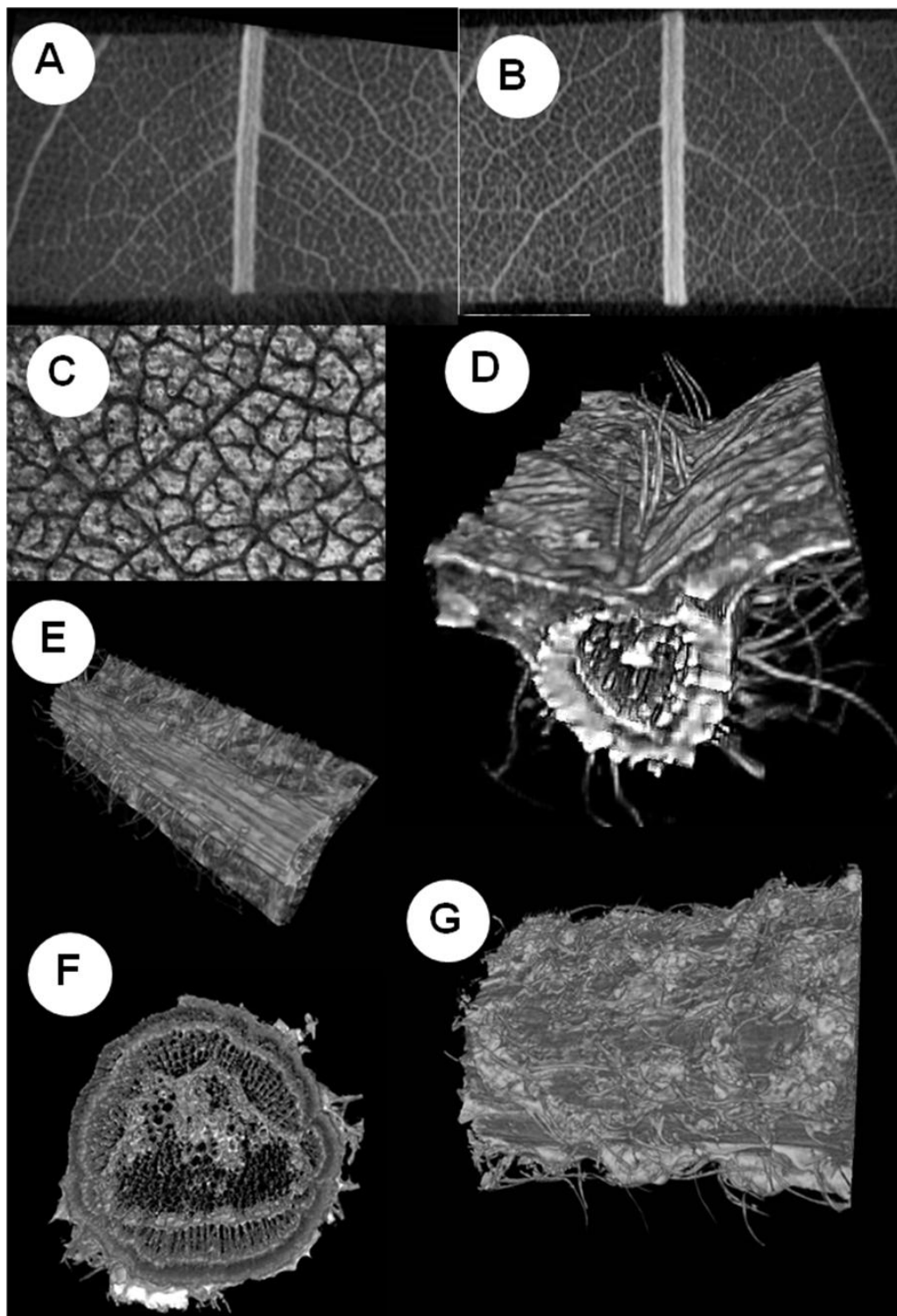
4.1.3 Microtomografia

Por meio da microtomografia foi investigado as microestruturas dos tecidos vegetais da espécie de *D. brasiliensis*, através da alta resolução das imagens. Com a filtração de Fourier, algumas paredes celulares do parênquima aparecem fortemente destacadas em comparação com o tecido cortical. Este realce de contraste é um artefato da recuperação de fase ocorrendo em limites e interfaces onde ocorrem fortes saltos de fase.

Os dados obtidos através da microtomografia confirmam as características morfológicas de *D. brasiliensis*, obtidas a partir de material fixado. A microtomografia tornou possível a visualização com precisão das estruturas dos elementos do feixe vascular, células do parênquima medular, os espaços intercelulares, além de confirmar a presença de estruturas secretoras como os idioblastos e tricomas (FIGURA 20).

As mesmas características também são observadas para as imagens obtidas a partir do caule e casca (FIGURA 21). Nestas imagens foi possível observar que as células e os elementos do xilema e floema estão completamente intactos, preenchidos com citoplasma/água. Nas regiões apresentadas com coloração branca, observaram-se os idioblastos com aspecto intacto. Em contraste, as áreas escuras representam espaços vazios, cheios de ar.

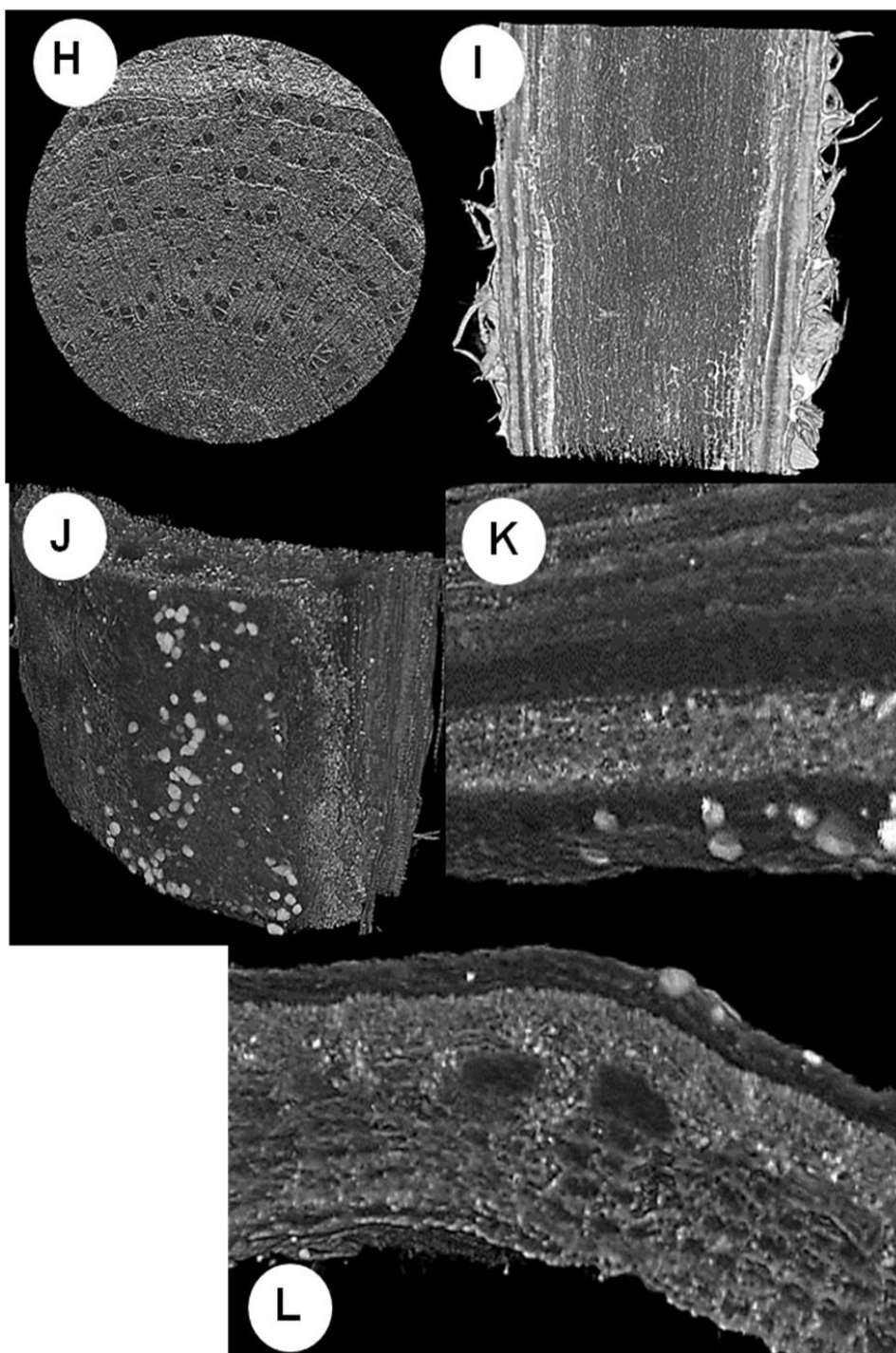
FIGURA 20 - ASPECTOS DA FOLHA DE *D. brasiliensis* OBTIDAS PELA TÉCNICA DE MICROTOMOGRAFIA



FONTE: O autor (2017)

NOTA: A. Face adaxial; B. Face abaxial; C. Detalhe da face abaxial evidenciando a estrutura da epiderme; D. Aspecto do feixe vascular da folha; E. Aspecto dos tricomas da face abaxial; F. Pecíolo; G. Aspecto dos tricomas presentes no pecíolo.

FIGURA 21 - ASPECTOS DO CAULE DE *D. brasiliensis* OBTIDAS PELA TÉCNICA DE MICROTOMOGRAFIA



FONTE: O autor (2017)

NOTA: H. Aspecto do caule em corte transversal, demonstrando os anéis de xilema; I. Detalhe das camadas de xilema, floema e parênquima em corte longitudinal; J. Detalhe do caule contendo inúmeros tricomas glandulares; K. Presença de tricomas glandulares na casca; L. Aspecto da casca, contendo epiderme, feloderme e súber.

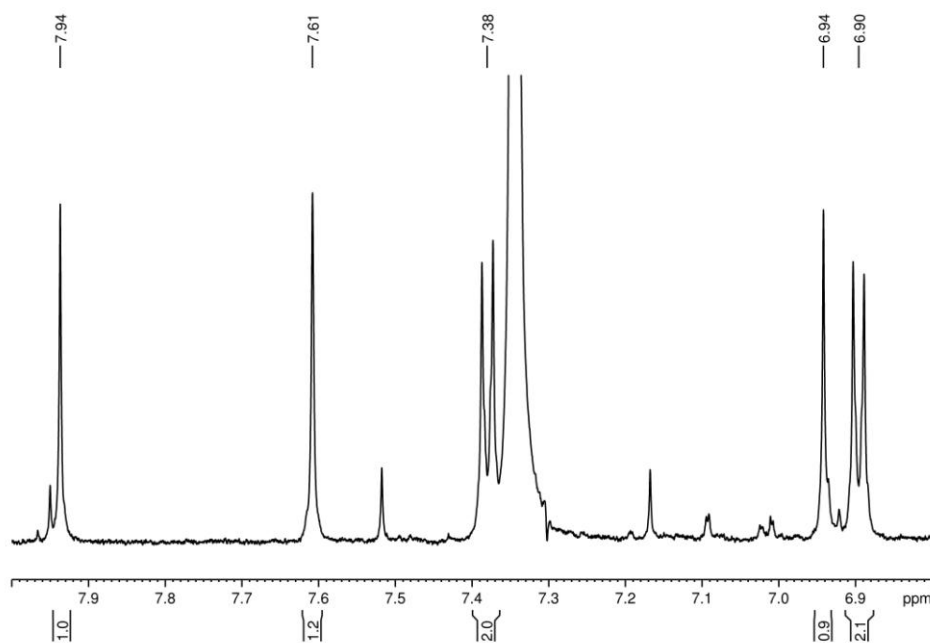
4.2 IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS

4.2.1 Fração clorofórmio da folha

O isolado obtido foi dissolvido em cloroformio deuterado (CDCl_3) e analisado em espectrômetros de RMN com frequência de 600MHz. No espectro de RMN- ^1H foram observados deslocamentos na região de 6,00 – 8,00 ppm referentes a anéis aromáticos de flavonoides. A FIGURA 22 apresenta os deslocamentos nesta região, onde consta um duplo dubleto na posição δ 7,38 (2H, $J=8.6$ Hz) e em δ 6,90 (2H, $J=8.6$ Hz), sinais que caracterizaram uma estrutura com anel *para* substituído. Os sinais em δ 7,94, δ 7,61 e δ 6,94 caracterizam hidrogênios ligados a anel aromático que correspondem ao H-2, H-5 e H-8, respectivamente.

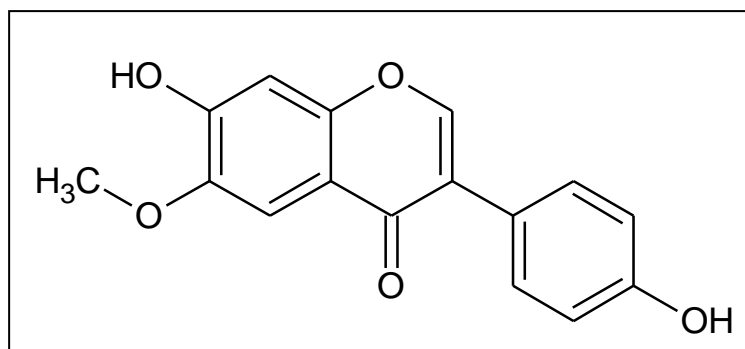
Considerando os sinais mais proeminentes e analisando as constantes de acoplamento, foi identificado a isoflavona gliciteína ou glicitina agliconada ou ainda, 4',7-dihidroxi-6-metoxisoflavona (FIGURA 23).

FIGURA 22 - EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,00 A 6,80 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA GLICITEINA

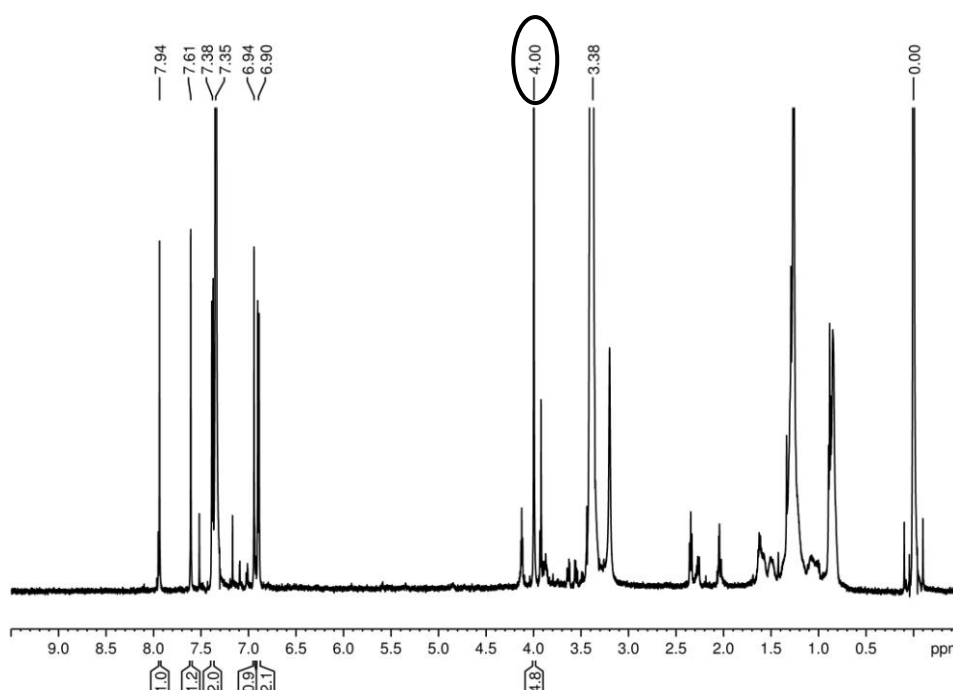


FONTE: O autor (2017)

FIGURA 23 - ESTRUTURA QUIMICA DA ISOFLAVONA GLICITEINA



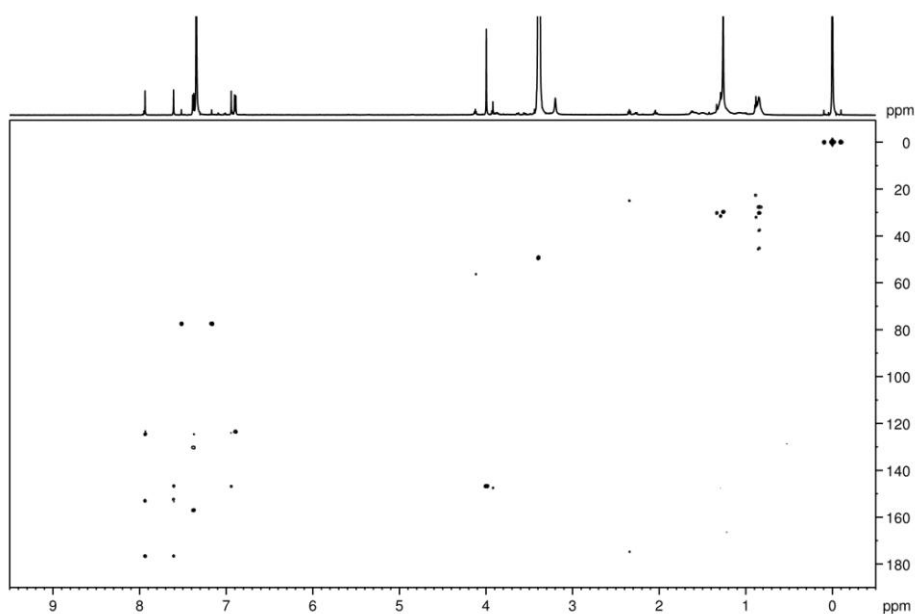
O deslocamento na região δ 4,00, FIGURA 24, é referente ao hidrogênio da metoxila ligado ao C-6 do anel aromático, que foi confirmado no espectro de HMBC (FIGURA 25), ao analisar os valores dos carbonos acoplados.

FIGURA 24 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DA GLICITEINA

FONTE: O autor (2017)

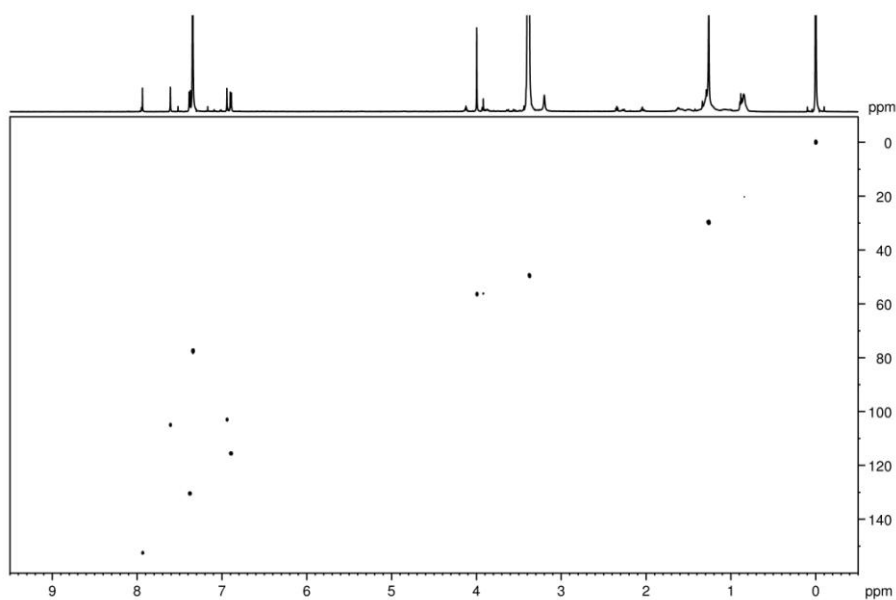
Pelo espectro de HMBC foram obtidos os deslocamentos dos carbonos acoplados a longa distancia e pelo espectro de HSQC (FIGURA 26) foram obtidos os deslocamentos dos sinais dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios. Os valores dos deslocamentos dos carbonos estão na TABELA 8, juntamente com os valores dos hidrogênios e da literatura utilizada para comparação.

FIGURA 25 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTANCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DA GLICETEÍNA



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 26 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DA GLICETEÍNA



FONTE: O autor (2017)

TABELA 8 - DESLOCAMENTO QUÍMICO DA GLICITEINA

Gliciteina				
Posição	Experimento (CDCl ₃)		Cunha (2013) (MEOD)	
	¹³ C δ (ppm)	¹ H J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H J (Hz)
2	152.4	7.94 s		8.09 s
3	124.6			
4	176.5			
5	105.0	7.61s		7.49 s
6	146.2			
7	152.2			
8	103.0	6.94 s		6.75 s
9	153.9			
10	123.9			
11	56.5	4.00 s		3.95 s
1'	123.1			
2'	130.5	7.38 dd (J=8.6)		7.4 dd (J=6.6,2.2)
3'	115.6	6.9 dd (J=8.6)		6.87 dd (J=6.6,2.2)
4'	151.3			
5'	115.0	6.9 dd (J=8.6)		6.87 dd (J=6.6,2.2)
6'	130.5	7.38 dd (J=8.6)		7.4 dd (J=6.6,2.2)

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: s= singleto dd= duplo dupleto J= constante de acoplamento

A gliciteina já foi identificada no gênero *Dalbergia* por Khan et al. (2000) na espécie *D. frutescens* onde testaram sua atividade sobre *Giardia intestinalis*, junto com outros compostos isolados, e sua atividade não foi considerada significativa.

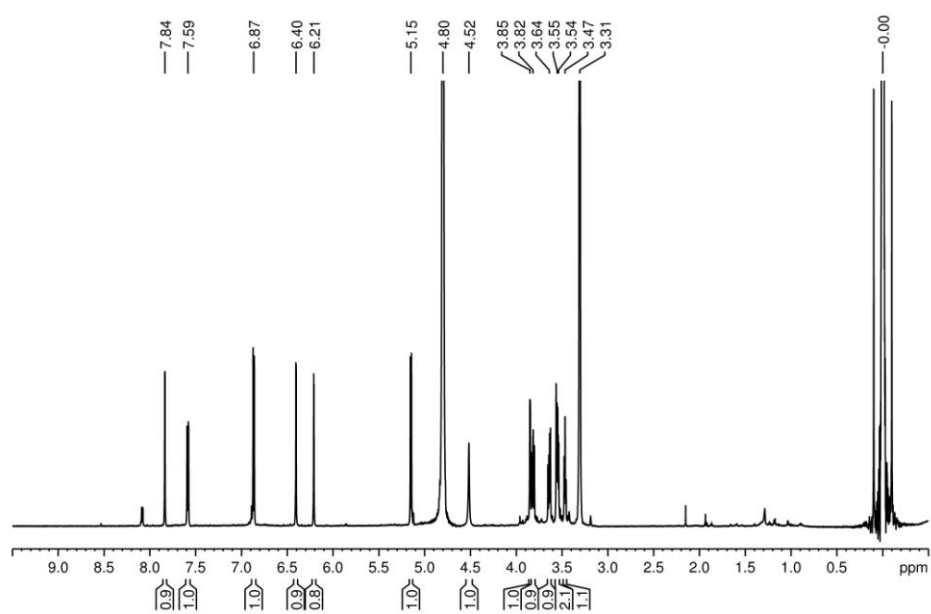
As isoflavonas são fitoestrógenos com potente atividade estrogênica. Os fitoestrógenos têm similaridade na estrutura com o hormônio feminino humano 17- β -estradiol, que pode se ligar aos receptores de estrogênio alfa e beta e imitar a ação dos estrogênios nos órgãos-alvo, exercendo muitos benefícios à saúde quando usado em algumas doenças. Numerosos estudos clínicos alegam benefícios destes compostos no câncer de mama e próstata, doenças cardiovasculares e osteoporose, bem como no alívio dos sintomas de pós-menopausa. A capacidade das isoflavonas em prevenir o câncer e outras doenças crônicas depende das propriedades farmacocinéticas destes compostos, em particular a absorção e distribuição para o tecido alvo. (SONG et al., 1999; VITALE et al., 2013).

A gliciteína, juntamente com a genisteína e a daidzeína, são isoflavonas agliconadas, encontradas em abundância nos grãos de soja (*Glycine max*). A forma química na qual ocorrem as isoflavonas é importante porque influencia sua biodisponibilidade e, portanto, sua atividade biológica. As isoflavonas conjugadas com glicose são compostos altamente polares, solúveis em água. Eles são dificilmente absorvidos pelo epitélio intestinal e têm atividades biológicas mais fracas do que as isoflavonas agliconas. (VITALE et al., 2013; SONG et al., 1999).

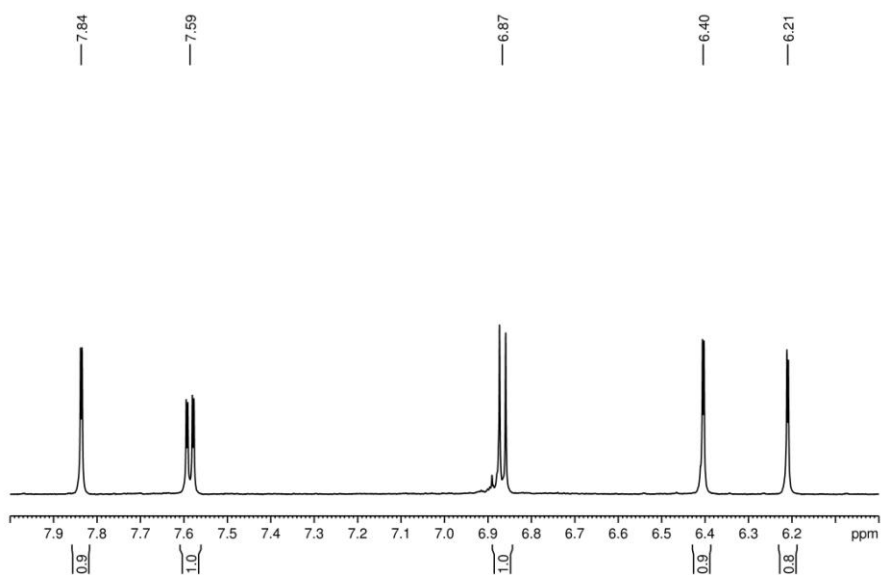
4.2.2 Fração acetato de etila da folha

O isolado foi dissolvido em metanol deuterado (MeOD- d_4) e analisado em espectrômetros de RMN com frequência de 600 MHz. No espectro de RMN- 1H foram observados deslocamentos na região de 6,00-8,00 ppm referentes aos anéis aromáticos de flavonoides, além de deslocamentos na região de 3,00-4,20 ppm (FIGURAS 27 e 28), característicos de glicosídeos, confirmando assim a presença de um açúcar.

Na FIGURA 28, os sinais dos hidrogênios aromáticos em δ 7,84 (1H, $J=2.1$ Hz) do H-2', em δ 6,87 (1H, $J=8.5$ Hz) do H-5' e em δ 7,59 (1H, $J=8.5;2.1$ Hz) do H-6' indicam acoplamento *meta* entre H2' e H6', e acoplamento *orto* entre H5' e H6', caracterizando uma dioxigenação do anel B em C3' e C4'. Nesta região também se observou os dubletos referentes aos hidrogênios H-6, δ 6,21 (1H, $J=2.1$ Hz), e H-8, δ 6,4 (1H, $J=2.1$ Hz), característico de um acoplamento *meta* de um anel aromático, os quais correspondem ao anel A do flavonóide substituído em C-5 e C-7. (KALEGARI et al., 2011).

FIGURA 27 - ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE

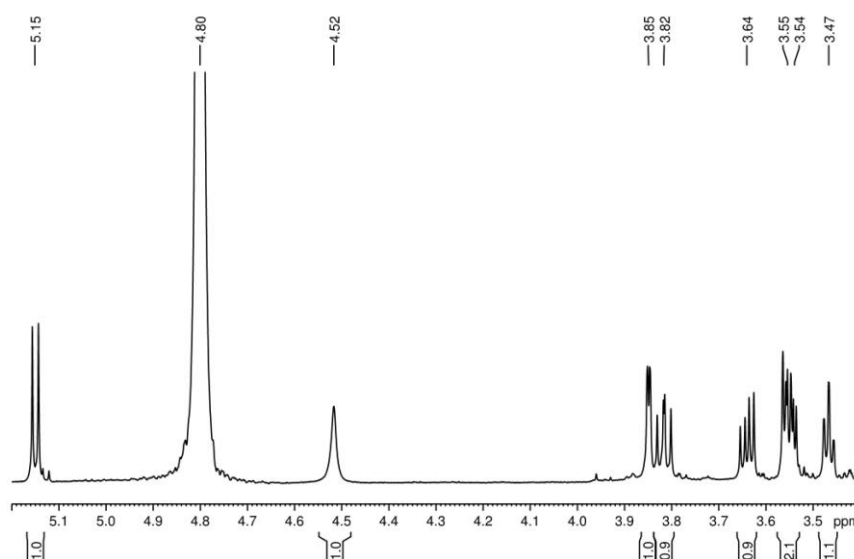
FONTE: O autor (2017)

FIGURA 28 - EXPANSÃO DA REGIÃO DE 8,00 A 6,00 PPM DO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE

FONTE: O autor (2017)

A FIGURA 29 representa o espectro expandido do açúcar da substância. Os duplodupletos em δ 3,82 (1H, $J= 3.6; 7.8$ Hz), δ 3,55 (1H, $J= 3.6; 3.3$ Hz) e δ 3,47 (1H, $J= 6.1; 5.9$ Hz) correspondem aos H-2'', H-3'', H-5'' respectivamente, e em δ 3,64 (1H, $J= 11.2; 6.0$ Hz) e δ 3,54 (1H, $J= 11.2; 5.9$ Hz), o hidrogênio H-6''. O multipletto em δ 3,85 (1H, $J=3.3$ Hz) representa o H-4'' que se encontra na posição equatorial, devido ao baixo valor da constante de deslocamento, caracterizando o açúcar como sendo uma galactose. A configuração deste açúcar foi determinada pela constante de acoplamento do carbono anomérico (H-1'' δ 5,15 $J=7.8$ Hz), confirmando uma configuração β .

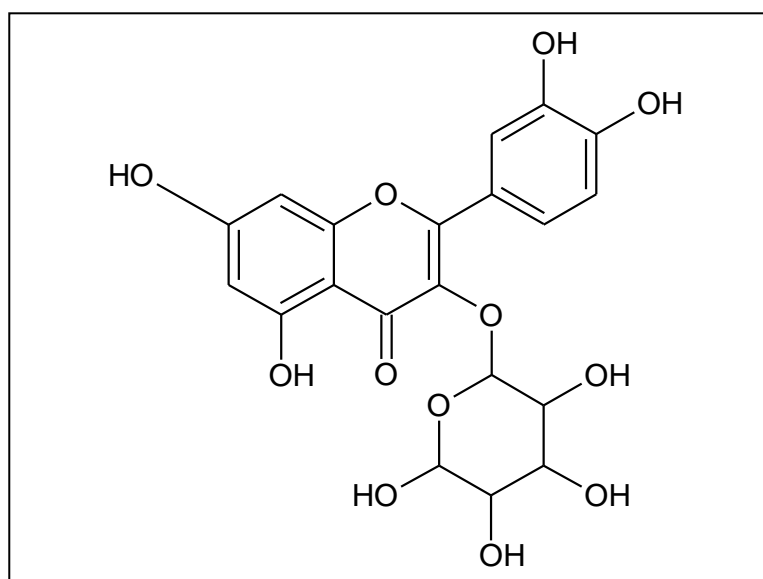
FIGURA 29 - EXPANSÃO DA REGIÃO DO AÇUCAR NO ESPECTRO DE RMN DE ^1H DO HIPEROSIDE



FONTE: O autor (2017)

Através dos resultados obtidos e pela comparação com dados da literatura (TABELA 9) pode-se concluir que o composto é a quercetina-3-O- β -galactosideo, um flavonoide também conhecido por hiperoside ou hiperosin. Sua estrutura química está ilustrada na FIGURA 30.

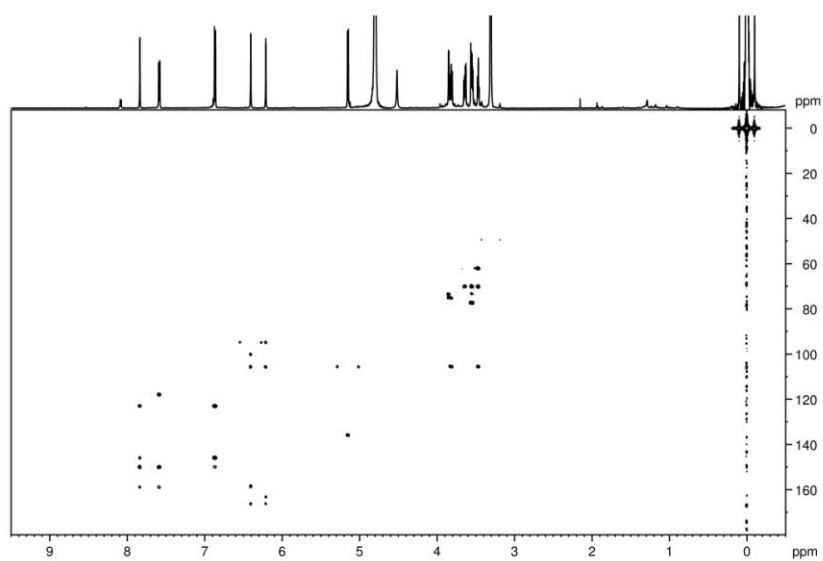
FIGURA 30 - ESTRUTURA QUÍMICA DO FLAVONOIDE HIPEROSIDE



Na FIGURA 31, espectro de HMBC, identificou-se a constante de acoplamento do carbono anomérico da galactose ao C-3 ($J=135.7$) do anel aromático. Pelo espectro de HSQC (FIGURA 32) foram obtidos os deslocamentos dos sinais dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios (TABELA 9).

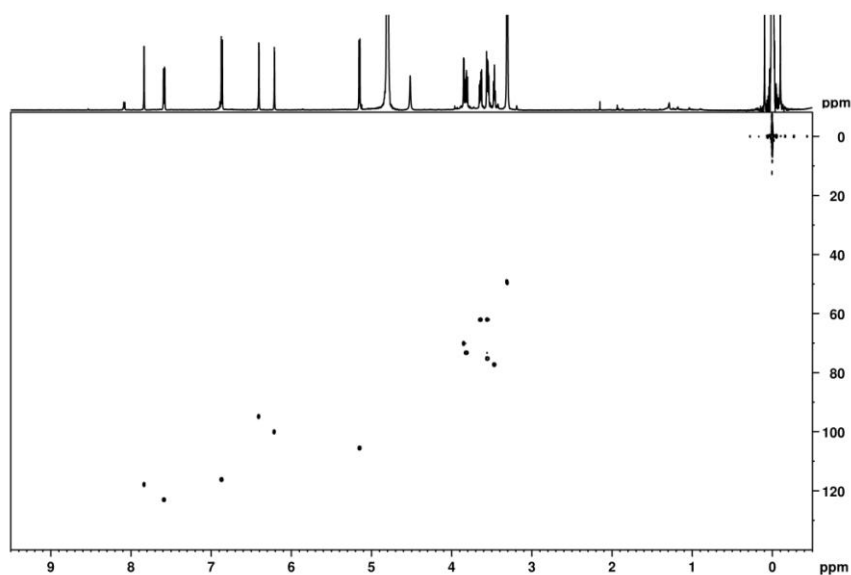
O flavonoide hiperoside é um constituinte farmacologicamente ativo importante da espécie *Hypericum perforatum* (ZOU et al., 2004), além de possuir várias atividades biológicas e farmacológicas reconhecidas. Wang, S. et al. (1996) demonstraram que o hiperoside possui um efeito protetor contra a lesão de isquemia miocárdica através da atenuação da peroxidação lipídica. Lee et al. (2004) estudaram a atividade anti-inflamatória do hiperoside o qual mostrou inibir significativamente a liberação de PGE_2 em macrófagos peritoneais de ratos. Liu et al. (2005), relatou a atividade do hiperoside em proteger as células PC12 quando foi induzida uma citotoxicidade por peróxido de hidrogênio e hidroperóxido de terc-butila. Katavic et al. (2007) identificou a atividade antagonista do receptor opioide nesta mesma substância. Zhang, Y. et al. (2014) relatou sua forte atividade antioxidante. Zhang, N. et al. (2014) estudou o hiperoside no tratamento de osteossarcoma, inibindo a proliferação celular e induzindo a diferenciação osteoblástica de células de osteossarcoma.

FIGURA 31 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTÂNCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DO HIPEROSIDE



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 32 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DE EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DO HIPEROSIDE



FONTE: O autor (2017)

TABELA 9 - DESLOCAMENTO QUÍMICO DO HIPEROSIDE

Quercetina-3-O-β-galatosideo									
Posição	Experimento (MEOD)			Kalegari et al. (2011) (MEOD)		Zhang et al.(2014) (DMSO-d6)			
	¹³ C δ (ppm)	¹ H J (Hz)	HMBC	¹³ C δ (ppm)	¹ H J (Hz)	¹³ C δ (ppm)	¹ H J (Hz)	HMBC	COSY
2	156.8			156.2		156.28			
3	135.7			133.5		133.99			
4				177.5		177.97			
5	163.0			161.3		161.71	12.63 s	C5,C6, C10	
6	100.0	6.21 d (2.1)	C5,C7, C8,C10	98.7	6.20 d	99.16	6.21 d (1.9)	C5,C7, C8,C10	H8
7	160.2			164.2		164.66			
8	94.9	6.4 d (2.1)	C6,C10, C9,C7	93.5	6.4 d	93.98	6.41 d (1.9)	C6,C10, C9,C7	H6
9	158.5			156.3		156.79			
10	105.7			103.9		104.39			
1'	121.0			121.1		121.59			
2'	117.7	7.84 d (2.1)	C3',C4', C6'	115.9	7.5 d	115.67	7.53 d (2.0)	C6',C4', C2	
3'	145.8			144.9		145.30			
4'	149.9			148.5		148.95			
5'	116.1	6.87 d (8.5)	C6',C3', C4'	115.2	6.8 d (J=8 Hz)	116.44	6.81 d (8.5)	C1', C3'	H6'
6'	123.0	7.59 dd (8.5, 2.1)	C2',C4', C2	122.1	7.65d (J=8 Hz)	122.46	7.67 dd (8.5,2.0)	C2', C4'	H5'
1''	103.2	5.15 d (7.8)	C3	101.8	5.39 d (J=7.8Hz)	102.33	5.38 (7.8)	C3	
2''	73.3	3.82 dd (3.6,7.8)		71.2	3.55 d (J=7.8,3.9H z)	71.70	3.57 dd		
3''	75.2	3.55 dd (9.6,3.3)		73.2	3.33	73.69	3.39 dd		
4''	70.1	3.85 d (3.3)		67.9	3.64	68.41	3.71 dd		
5''	77.2	3.47 ddm (6.0, 5.9)		75.9	3.3	76.32	3.33 dd		
6''	60,2	3.64 dd (11.2, 6.0) 3.54 dd (11.2, 5.9)		60.2	3.25 3.45 (2H)	60.62	3.51 dd		

FONTE: O autor (2017)

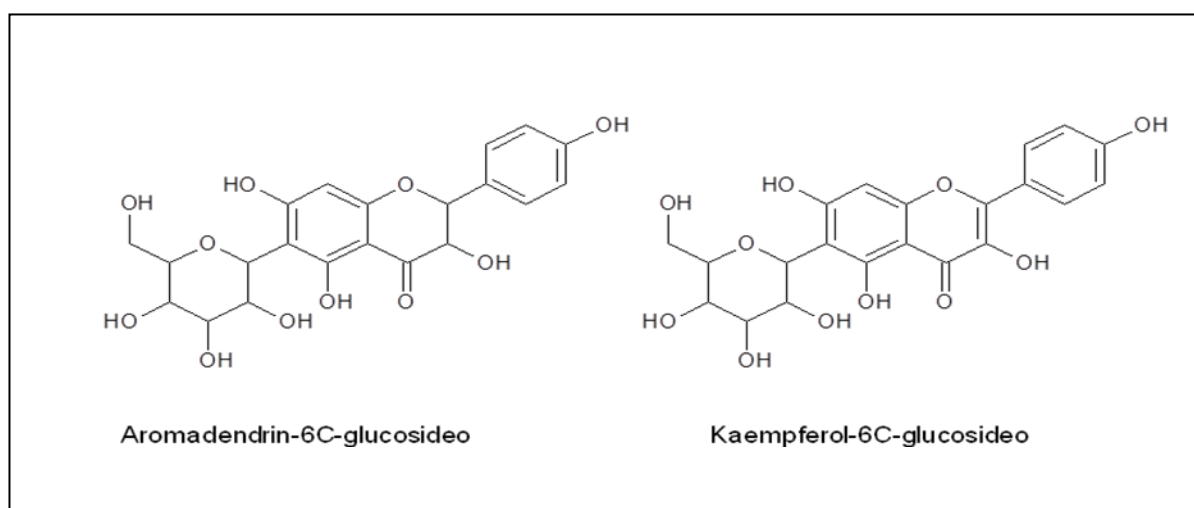
LEGENDA: s=singleteo d=dupleteo dd=duplo dupleteo J= constante de acoplamento

4.2.3 Fração acetato de etila da casca

Após a purificação da fração acetato de etila da casca obtiveram-se dois isolados que foram dissolvidos em metanol deuterado (MeOD-d₄) e analisados em espectrômetros de RMN com frequência de 600MHz.

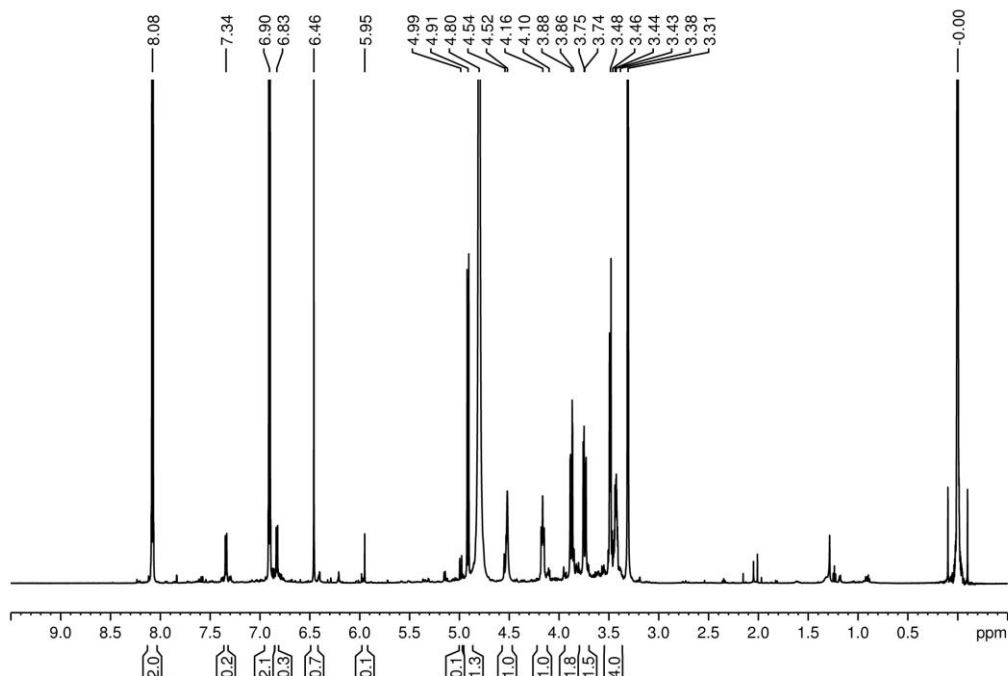
O primeiro isolado (44 mg) foi identificado como uma mistura da flavonona aromadendrin-6-C-glucosideo e o flavonoide Kaempferol-6-C-glucosideo (FIGURA 33) e o segundo (32 mg), o flavonoide Kaempferol-6-C-glucosideo puro. Estes compostos, primeira vez identificados no gênero *Dalbergia*, assim como na família Fabaceae, possuem poucos estudos na literatura. Chang et al. (1990) identificaram estes compostos na espécie *Hemiptelea davidii* pela primeira vez e apresentaram suas atividades antioxidantes.

FIGURA 33 – ESTRUTURA QUÍMICA DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSIDEO E O KAEMPFEROL-6-C-GLUCOSIDEO



No espectro de RMN-¹H (FIGURA 34) verificou-se deslocamentos de diferentes intensidades, caracterizando uma mistura em uma proporção aproximada de 1:10 (aromadendrin-6-C-glucosideo:kampferol-6-C-glucosideo), segundo os valores das integrais relativas entre os sinais do espectro de ¹H.

FIGURA 34 - ESPECTRO DE RMN ^1H DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSÍDEO



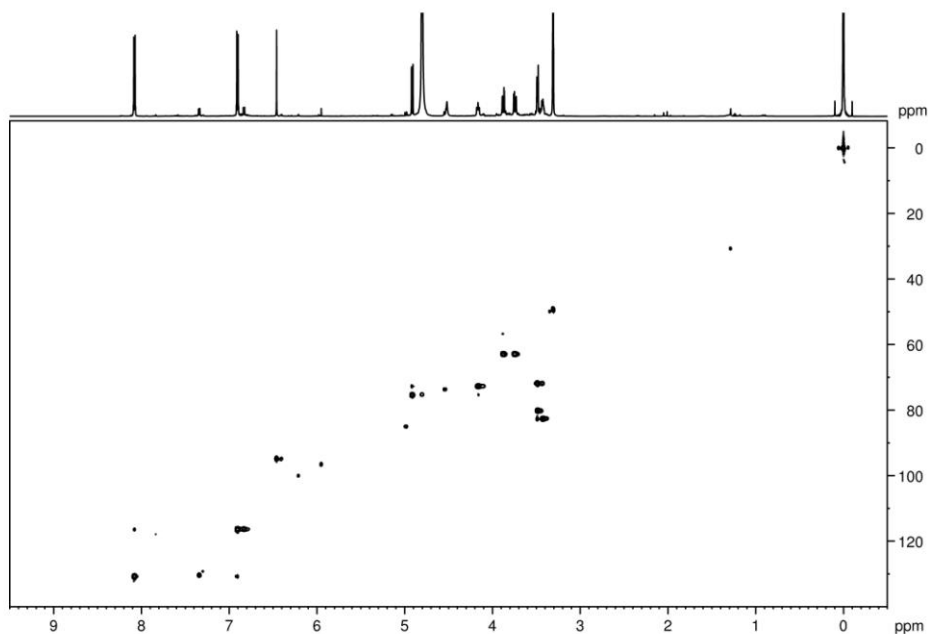
FONTE: O autor (2017)

O espectro do aromadendrin-6-C-glucosídeo apresenta dupletos em δ 7,34 (2H, $J=8.6$ Hz) e δ 6,83 (2H, $J=8.6$ Hz) indicando acoplamentos meta entre H-2' e H-6' e, H-3' e H-5'.

Para o kampferol-6-C-glucosídeo, os dupletos ocorreram em δ 8,08 (2H, $J=9.0$ Hz) e δ 6,90 (2H, $J=9.0$ Hz), indicando acoplamentos meta entre H-2' e H-6' e, H-3' e H-5'. A ausência de sinais de hidrogênio entre C-2 e C-3, indicou a presença de uma dupla ligação no anel aromático do Kaempferol-6-C-glucosídeo, confirmado também, pelos valores dos deslocamentos químicos dos carbonos obtidos pelos espectros bidimensionais.

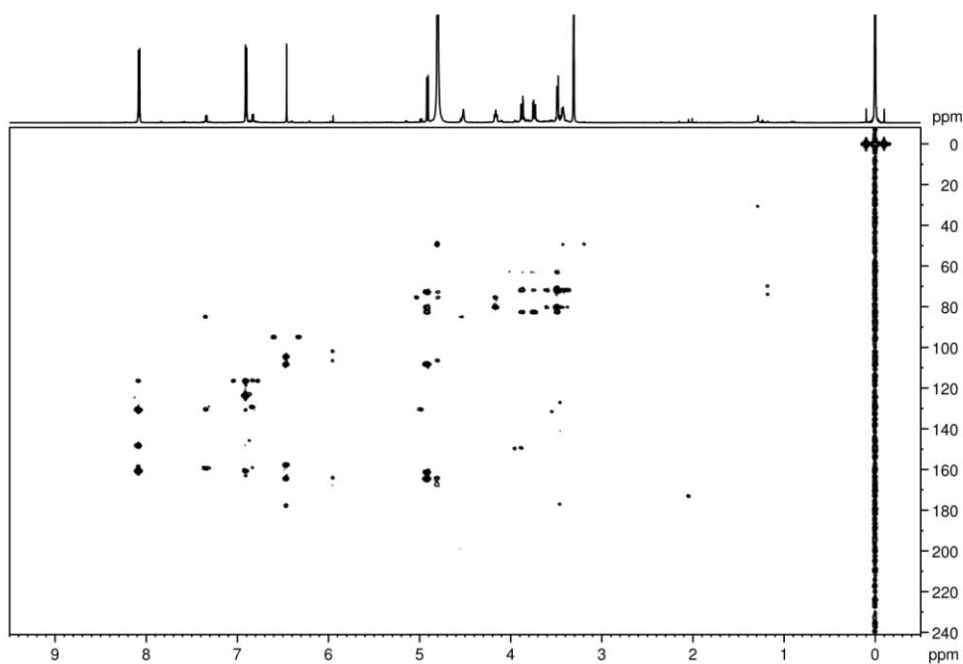
Pelo espectro de HSQC (FIGURA 35) foram obtidos os deslocamentos dos sinais dos carbonos diretamente ligados aos hidrogênios e pelos espectros de HMBC (FIGURA 36) os deslocamentos dos carbonos acoplados a longa distância. Estes se encontram na TABELA 10, juntamente com os valores dos hidrogênios da literatura utilizada para comparação.

FIGURA 35 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HSQC DA AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSÍDEO



FONTE: O autor (2017)

FIGURA 36 - ESPECTRO DE CORRELAÇÃO A LONGA DISTANCIA DE $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ DO EXPERIMENTO DE RMN DE HMBC DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E KAMPFEROL-6-C-GLUCOSÍDEO



FONTE: O autor (2017)

TABELA 10 - DESLOCAMENTOS QUÍMICOS DO AROMADENDRIN-6-C-GLUCOSÍDEO E KAMPFEROL -6-C-GLUCOSÍDEO

Posição	Aromadendrin 6-C-glucosídeo (MEOD)				Kamferol 6-C-glucosídeo (MEOD)			
	Experimento (MEOD)		Chang <i>et al.</i> (1990) (DMSO-d6)		Experimento (MEOD)		Chang <i>et al.</i> (1990) (DMSO-d6)	
	¹³ C δ(ppm)	¹ H J (Hz)	¹³ C δ(ppm)	¹ H J (Hz)	¹³ C δ(ppm)	¹ H J (Hz)	¹³ C δ(ppm)	¹ H J (Hz)
2	84.9	4.99 d (J=11.6)	82.9	5.08 d (J=11.2)	148.2		146.6	
3	73.3	4.54 d (J=11.6)	71.5	4.58 d (J=11.2)			135.8	
4	198.3		198.1		177.7		176.2	
5			162.7		161.2		159.9	
6	106.4		106.1		108.4		108.3	
7	164.1		166.2		164.5		163.5	
8	96.5	5.95 s	94.9	6.00 s	94.8	6.46 s	93.2	6.47 s
9	160.8		161.4		157.6		159.3	
10	101.8		100.2		104.5		102.7	
1'	129.2		127.6		123.6		121.8	
2'	130.3	7.34 d (J=8.6)	129.5	7.39 d (J=8.2)	130.7	8.08 d (J=9.0)	129.6	8.05 d (J=8.8)
3'	116.2	6.83 d (J=8.6)	115.0	6.87d (J=8.2)	116.4	6.90 d (J=9.0)	115.6	6.92 d (J=8.8)
4'	153.3		157.8		160.6		155.2	
5'	116.2	6.83 d (J=8.6)	115.0	6.87d (J=8.2)	116.4	6.90 d (J=9.0)	115.6	6.92 d (J=8.8)
6'	130.3	7.34 d (J=8.6)	129.5	7.39 d (J=8.2)	130.7	8.08 d (J=9.0)	129.6	8.05 d (J=8.8)
1''	75.2	4.80	73.0	4.57 d (J=10)	75.2	4.91 d (J=9.9)	73.2	4.61 d (J=9.4)
2''	80.1	3.44m	70.7		60.3	3.48	70.7	
3''	74.6	4.10m	79.1		72.7	4.16	79.0	
4''	71.8	3.46m	70.3		71.9	3,48	70.3	
5''	82.6	3.38 ddd	81.6		82.6	3.43 ddd (J=7.9, 5.4, 2.3)	81.7	
6''	63.0	3.86 dd 3.75 dd	61.6		63.0	3.88 dd (J=12.2,2.3) 3.74 dd (J=12.2,5.4)	61.5	

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: d=dupleteo dd=duplo dupleteo ddd=triplo dupleteo s=singleteo m=multiploteo J= constante de acoplamento

4.3 ATIVIDADE ALELOPÁTICA

O estudo procura determinar o efeito de uma planta doadora sobre uma espécie alvo (planta receptora). O ensaio mais utilizado para testar a atividade alelopática é a inibição, ou, algumas vezes, a estimulação da germinação e do crescimento de sementes de espécies silvestres ou de culturas. (MALHEIROS, PERES, 2001).

Geralmente os agentes alelopáticos são metabólitos secundários, podendo ser produzido em qualquer parte da planta e variar a concentração dentro de uma espécie, porém o efeito alelopático raramente é provocado por uma única substância, geralmente se deve ao conjunto delas. (MALHEIROS, PERES, 2001).

Substâncias químicas como terpenos, compostos fenólicos, cumarinas, flavonóides, alcalóides, glicosídeos, taninos e quinonas, oriundas do metabolismo secundário dos vegetais, podem desencadear efeitos benéficos ou maléficos sobre outros vegetais ou demais organismos. (PINÃ- RODRIGUES; LOPES, 2001).

Um dos aspectos que mais exercem influência nos resultados dos bioensaios de alelopatia é a planta receptora. Em muitos dos trabalhos existentes na literatura, observa-se a utilização de uma espécie; em outros, duas ou mais espécies são empregadas na avaliação dos efeitos alelopáticos. A espécie mais utilizada é a *Lactuca sativa* (alface) que é extremamente sensível aos efeitos dos extratos e aleloquímicos. Essa característica é importante quando se precisam identificar atividades sutis, porém pode induzir erros, pois pode levar a superestimar a atividade fitotóxica ou mesmo induzir fitotoxicidade onde na realidade é inexpressiva. Portanto, o uso de mais de uma espécie permite melhor dimensionamento das reais potencialidades alelopáticas das espécies doadoras do que simplesmente utilizar uma única espécie, além de possibilitar inferências mais amplas e mais próximas da realidade. (SOUZA et al., 2010).

Os efeitos alelopáticos dos extratos etanólicos brutos e frações da *D. brasiliensis* foram avaliados sobre a germinação e crescimento de alface (*Lactuca sativa*) e cebola (*Allium cepa*).

4.3.1 Teste de Germinação

Para o teste de germinação foi calculada o índice de velocidade de germinação (IVG) do extrato etanólico bruto (EB), frações hexano (FH), clorofórmio (FC) e acetato de etila (FAE) das folhas e cascas da *D. brasiliensis*, os quais foram submetidos à estatística ANOVA seguido de teste de Tukey.

Os resultados obtidos mostraram que todas as concentrações inibiram o tempo de germinação em alface. A FH das folhas e cascas provocaram atraso acentuado, quando comparadas as demais, e a FAE das cascas também provocou efeito semelhante ao observado para a FH, conforme demonstrado no QUADRO 1.

QUADRO 1 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE *D. brasiliensis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *L. sativa*

Índice de velocidade de germinação (IVG)		
EB		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	83.33±2.19	98.00±0.66
1000 µg	69.48±3.18*	47.58 ±1.17*
500 µg	74.24±2.23*	49.16±1.26*
250 µg	87.3±3.45*	48.81±2.65*
FH		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	83.33±2.19	98.00±0.66
1000 µg	44.63±2.47*	47.45±1.17*
500 µg	47.54±1.28*	47.80±2.37*
250 µg	49.54±1.12 *	48.33±1.22*
FC		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	83,33±2.19	98.00±0.66
1000 µg	61.66±1.33*	48.88 ±1.17*
500 µg	57.77±2.37*	47.70±1.26*
250 µg	64.72±1.89*	47.62±2.65*
FAE		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	83,33±2.19	98.00±0.66
1000 µg	72.36±2.47*	48.56±1.17*
500 µg	83.95±1.28 ^{NS}	48.26±2.37*
250 µg	84.44±1.12 ^{NS}	47.22±1.22*

FONTE: O autor (2017)

NOTA: Média ± desvio padrão. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey. ^{NS}A média do tratamento não difere significativamente da média do controle.

Em cebola, foi observado o efeito hormese para o EB e FH das folhas, com atividade inibitória para a concentração de 250 µg/ml (75,91 e 74,43, respectivamente). A FC e FAE das folhas estimulou a velocidade de germinação em sementes de cebola em todas as concentrações testadas, e este estímulo não foi considerado dose-dependente. Todas as concentrações do EB e FAE obtidos a partir das cascas inibiram a velocidade de germinação em sementes de cebola, e as concentrações de 500 e 1000 µg/ml da FH e FCL foram as que mais afetaram a velocidade de germinação desta espécie, demonstrando que estas possuem mecanismo seletivo para monocotiledôneas (QUADRO 2).

QUADRO 2 - EFEITO DO EXTRATO E FRAÇÕES DAS FOLHAS E CASCAS DE *D. brasiliensis* SOBRE O ÍNDICE DE VELOCIDADE DE GERMINAÇÃO (IVG) DE *A. cepa*

Índice de velocidade de germinação (IVG)		
EB		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	41.73±1.84	64.67±1.15
1000 µg	45.80±1.23*	40.45 ±1.12*
500 µg	66.82±1.56*	46.33±1.00*
250 µg	75.91±1.07*	34.54±1.07*
FH		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	41.73±1.84	64.67±1.15
1000 µg	62.19±1.33*	33.84±1.05*
500 µg	58.39±1.17*	33.77±1.12*
250 µg	74.43±1.13*	47.29±1.00*
FC		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	41.73±1.84	64.67±1.15
1000 µg	75.07±1.33*	37.60 ±1.00*
500 µg	68.63±2.37*	35.58±1.12*
250 µg	76.23±1.89*	43.20±1.05*
FAE		
n = 4 repetições	Folhas	Cascas
Controle	41.87±1.13	64.67±1.15
1000 µg	74.26±1.17*	48.03±1.05*
500 µg	72.86±1.33*	42.43±1.13*
250 µg	84.44±1.32*	41.48±1.15*

FONTE: O autor (2017)

NOTA: Média ± desvio padrão. *A média do tratamento difere significativamente ($p < 0,05$) em comparação com a média do controle, pelo teste de Tukey.

A declaração de que "o veneno está na dose" é bem conhecida nas áreas de toxicologia ambiental e médica, e numerosos exemplos ilustram que o relacionamento dose-resposta desempenha um papel importante para o meio ambiente, médico e problemas de saúde pública. No entanto, apenas nas últimas duas décadas, o fenômeno da hormese, o efeito estimulador de uma baixa dose de um produto tóxico, obtiveram maior reconhecimento. (DUKE et al., 2006). A hormese foi descrita para vários grupos de organismos, sendo estes relatos do fenômeno dos efeitos estimulantes de baixas concentrações, utilizado para explicar efeitos tóxicos em alelopatia. (BELS e PIEPHO, 2012).

O herbicida glifosato é um exemplo da ocorrência da hormese que, em concentrações muito baixas, instiga o crescimento de plântulas. (WAGNER et al., 2003).

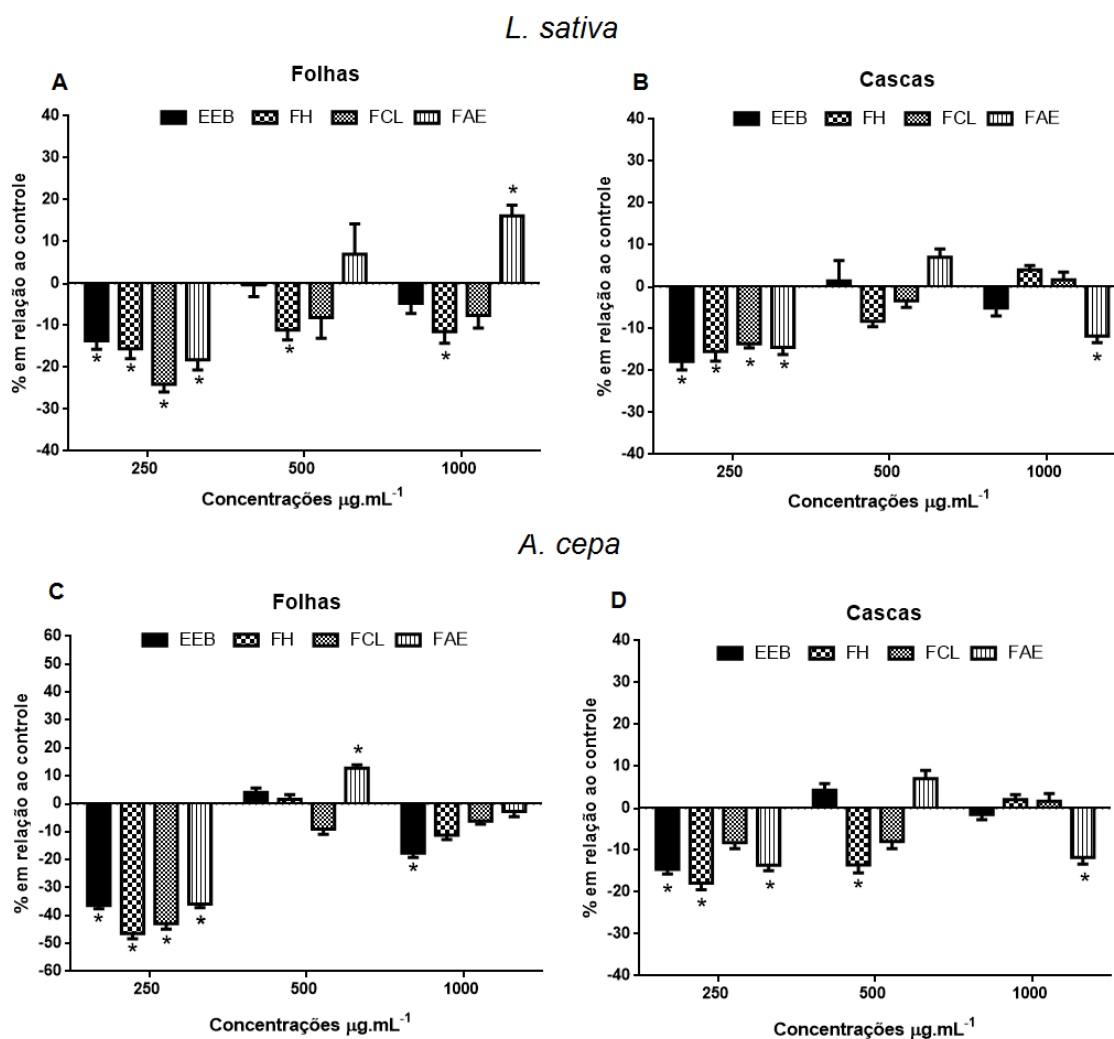
4.3.2 Teste de Crescimento

O bioensaio do crescimento foi realizado por meio da medida, utilizando papel milimetrado, da radícula e do hipocótilo/coleótilo da *L. sativa* e *A. cepa* submetidos aos extratos e frações de *D. brasiliensis*.

A FIGURA 37 apresenta o resultado do ensaio de crescimento da radícula ou raiz primária da alface e da cebola em presença do extrato e frações da *D. brasiliensis*. Com relação ao crescimento da radícula da alface, foi observado que a concentração de 250 µg/ml do EB e frações das folhas e cascas foram capazes de afetar o crescimento, com maior efeito inibitório para a FC (24%) das folhas e EB (17%) das cascas. Efeito inibitório também foi observado para as concentrações de 500 µg/ml (11,1%) e 1000 µg/ml (11,44%) da FH das folhas, e a maior concentração da FAE proveniente das folhas estimulou o crescimento da raiz em 16,15% (FIGURA 37 A e B). A concentração de 1000 µg/ml da FAE das cascas também demonstrou ser capaz de inibir o crescimento da raiz primária de *L. sativa* em 11% (FIGURA 37 B).

Em cebola, o efeito hormese foi verificado, demonstrando atividade inibitória para a concentração de 250 µg/ml, para o EB e todas as frações estudadas com atividade similar para a FH (46%) e FC (42%) das folhas. Embora o efeito inibitório também tenha sido observado para o extrato das cascas, essa atividade foi menor do que a observada para as folhas (FIGURA 37 C e D).

FIGURA 37 - CRESCIMENTO DA RADÍCULA DA ALFACE E DA CEBOLA EM PRESENÇA DO EXTRATO E FRAÇÕES DA *D. brasiliensis*



FONTE: O autor (2017)

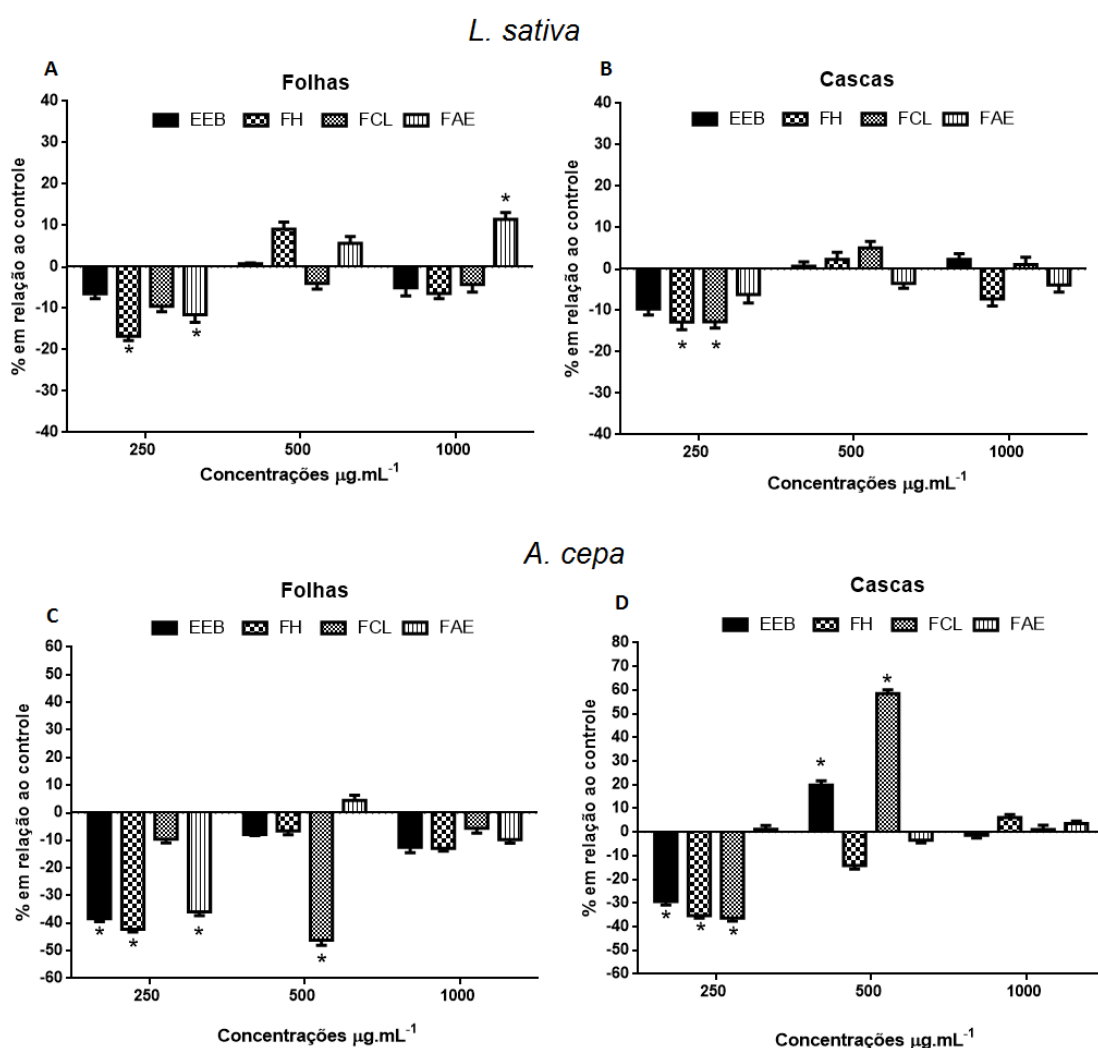
NOTA: Efeito do EEB e frações das folhas (250, 500 e 1000 µg/mL) da *D. brasiliensis* no crescimento da radícula das folhas (painel A) e das cascas (painel B) da *L. sativa*, e da radícula das folhas (painel C) e das cascas (painel D) do *A. cepa*. Cada coluna representa a média ± erro padrão do crescimento. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida do teste de tukey.

A FIGURA 38 apresenta o resultado do ensaio de crescimento do hipocótilo da alface e do coleótilo da cebola em presença do extrato e frações da *D. brasiliensis*.

Com relação ao crescimento do hipocótilo da alface, o efeito inibitório foi observado para a concentração de 250 µg/ml da FH e FAE das folhas (16,8%; 11,5%, respectivamente) e cascas (12,7% e 12,8%, respectivamente), demonstrando que a atividade fitotóxica não está condicionada à concentração dos

extratos (FIGURA 38 A e B). Na cebola, verificou-se que a concentração de 250 $\mu\text{g/ml}$ do EB (38,4%), FH (42%) e FAE (35,8%) das folhas, provocaram inibição do coleóptilo, e somente a FAE na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ reduziu o crescimento em 46%. O EB e FC obtidos da casca, na concentração de 500 $\mu\text{g/ml}$ provocaram o alongamento do coleóptilo em 19% e 58%. Todas as frações na menor concentração inibiram o crescimento do coleóptilo, sendo mais evidente o efeito para a FH (35%) e FCL (36%) em relação ao controle.

FIGURA 38 - CRESCIMENTO DO HIPOCÓTILO/COLEÓTILO DA ALFACE E DA CEBOLA EM PRESENÇA DO EXTRATO E FRAÇÕES DA *D. brasiliensis*



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB e frações das folhas (250, 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$) da *D. brasiliensis* no crescimento do hipocótilo das folhas (painel A) e das cascas (painel B) da *L. sativa*, e do coleóptilo das folhas (painel C) e das cascas (painel D) do *A. cepa*. Cada coluna representa a média \pm erro padrão do crescimento. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$, quando comparados ao grupo controle. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida do teste de tukey.

Os resultados apresentados pelas frações com caráter lipofílico podem estar relacionados aos resultados obtidos no perfil antioxidante da espécie (TABELA 7) para as mesmas frações: FH e FCL. Estudos no campo de alelopatia tem demonstrado que substâncias de caráter lipofílico como terpenos podem afetar a proliferação celular e a síntese de DNA em meristemas de plantas (Nishida et al., 2005); uma vez que o processo de mitose pode se mostrar alterado levando a um aumento desenfreado das células em divisão, danificando as tubulinas e resultando em núcleos poliploides. (Hallak et al., 1999; Sanchez-Moreiras et al., 2008).

O crescimento da raiz de *L. sativa* e *A. cepa* foi mais afetado do que o crescimento do hipocótilo/coleótilo. Baziramakenga et al. (1995), enfatiza que além do contato da raiz com a superfície onde estão depositados os extratos, os tecidos da raiz são mais permeáveis a aleloquímicos que pode alterar o crescimento inicial dos tecidos (Nishida et al., 2005), o que, portanto, pode prejudicar as atividades metabólicas de raiz e divisão celular nas extremidades das raízes. Esse tipo de alteração pode levar a redução do peso seco. (Singh et al., 2003).

Durante esta investigação acredita-se que o impacto negativo observado sobre os parâmetros acima mencionados é devido à presença de grandes quantidades aleloquímicos que possam ter significativamente e não significativamente aumentado e os níveis de estresse em *L. sativa* e *A. cepa*.

O impacto negativo do uso comercial de herbicidas no ambiente, torna desejável diversificar as opções de manejo de ervas daninhas. (PUTNAM, 1988; WESTON, 1996; NARWAL, 1999). Algumas plantas proporcionaram excelente controle de plantas daninhas em consórcio ou como aditivos para o solo. (WESTON, 1996; NARWAL, 1999; SEMIDEY, 1999; CAAMAL-MALDONADO et al., 2001).

Assim, a alelopatia é uma estratégia para reduzir a dependência comercial de herbicidas em programas práticos de controle de ervas daninhas (FAROOQ et al., 2011), pois substâncias naturais são consideradas mais benéficas do ponto de vista ambiental do que a maioria dos herbicidas sintéticos. (DUKE et al., 2000; MACÍAS et al., 2007). No entanto, apenas uma pequena percentagem das espécies de plantas foram fitoquimicamente analisadas apesar do fato das plantas fornecerem uma rica fonte de substâncias biologicamente ativas. (HOSTETTMANN, WOLFENDER, 1997; AMBROSIO et al., 2006).

Estes resultados são importantes, pois à medida que o uso de produtos químicos aumenta, alternativas agrícolas de controle de ervas daninhas ao atual programa dominado por herbicidas sintético estão sendo dada ampla consideração. Controlar as ervas daninhas através da alelopatia é uma estratégia para diminuir a dependência por herbicidas sintéticos. (PUTNAM, 1988; NARWAL, 1999; DUKE et al., 2000; MACÍAS et al., 2007). Estudos que demonstram a ação de resíduos e extratos vegetais como agentes supressores de ervas daninhas já foram demonstrados como alternativas. (WESTON, 1996; SEMIDEY, 1999; CAAMAL-MALDONADO et al., 2001). É possível que *D. brasiliensis* seja útil como um material supressor de ervas daninhas ou material aditivo do solo em uma variedade de configurações agrícolas na agricultura sustentável, podendo ser uma alternativa viável, uma vez que não apresentou toxicidade em ensaios como *A. salina*, atividade hemolítica e antimicrobiana.

4.4 ATIVIDADE LARVICIDA CONTRA O MOSQUITO *Aedes aegypti*

Dalarmi et al. (2015) avaliou a atividade dos extratos e frações da *D. brasiliensis* sobre as larvas do mosquito *Aedes aegypti* e observou-se um significativo resultado para a fração clorofórmica da casca (CL₅₀ 25 µg/ml). A partir deste resultado, avaliou-se neste estudo a atividade da mistura fujikinetina e afromorsina (proporção 1:3 respectivamente) isoladas da mesma fração da espécie. No entanto, a mistura obteve CL₅₀ de 134,0 µg/ml, ou seja, uma dose muito maior para provocar mortalidade nas larvas. A TABELA 11 apresenta o resultado do experimento com os isoflavonoides e os resultados anteriores retirados da literatura, para comparação. Possivelmente, o potencial larvicida desta fração ocorre por outro constituinte presente ou ainda, pelo sinergismo de substâncias presentes.

TABELA 11 - CL₅₀ E CL₉₀ DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA CONTRA LARVAS DE *Aedes aegypti*

Amostra	CL ₅₀ (µg/mL)	CL ₉₀ (µg/mL)	DP(±)
Fujikinetina Afrormosina	134 (116-131)	219 (190-225)	1.43
Extrato Bruto Folha*	30 (26-33)	91 (111-116)	1.34
Hexano Folha*	44 (36- 59)	81 (78-96)	1.26
Clorofórmio Folha*	33 (25-44)	75 (67-81)	1.87
Acetato Etila Folha*	24 (37- 49)	66 (51-78)	1.35
Extrato Bruto Casca*	32 (46-89)	71 (66-84)	1.24
Hexano Casca*	31 (29-51)	72 (67-85)	1.17
Clorofórmio Casca*	25 (16-38)	50 (32-68)	1.15
Acetato Etila Casca*	28 (19-33)	93 (115-121)	1.21

FONTE: * DALARMI *et al.* (2015)

NOTA: DP: desvio padrão, CL₅₀: concentração letal de 50%, CL₉₀: concentração letal de 90%

Segundo Pelt (1979) o fato de uma droga vegetal poder apresentar vários princípios ativos com o mesmo efeito pode possibilitar interações sinérgicas e, desse modo, ser superior em eficácia com relação aos componentes isolados. A corrente científica de que o todo representa mais que a soma das partes, já foi salientado em analogia com as plantas medicinais que caracterizar cada uma das partes isoladas não basta para seu conhecimento completo: “Uma planta inteira tem efeitos diversos de seus componentes”. Em alusão a isso, Pelt (1979) citou a alcachofra que, embora apresente substâncias que se mostram inativas quando analisadas isoladamente, quando presente em misturas com o princípio ativo, aumentam sua atividade em doses equipotentes.

4.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana da espécie foi avaliada através do método da Concentração Mínima Inibitória (CIM). Para Rios, Recio e Villar (1988) a determinação da CIM é considerada a melhor metodologia para avaliar a suscetibilidade ou resistência de bactérias a antimicrobianos.

Todas as amostras testadas, extratos brutos, frações e a mistura fujikinetina e afrormosina (1:3) apresentaram um valor de CIM superior a 1000 µg/ml, conforme

demonstrado na TABELA 12, sendo consideradas inativas. (HOLETZ et al., 2002). O resultado negativo para a atividade antimicrobiana, somado aos ensaios já realizados com a espécie, *Artemia salina* e atividade hemolítica, os quais não apresentaram toxicidade (DALARMI, 2012), apontam para um caráter atóxico dos produtos obtidos das folhas e caule da planta.

TABELA 12 - CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA DAS AMOSTRAS da *D. brasiliensis*

	CIM (mg/ml)									Padão	
	EBF	FHF	FCF	FAEF	EBC	FHC	FCC	FAEC	Afror Fujik		
<i>B. subtilis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	4,23 ^a
<i>S. aureus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	3,12 ^a
<i>S. epidermidis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	3,12 ^a
<i>S. saprophyticus</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	4,22 ^a
<i>P. aeruginosa</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	3,12 ^a
<i>E. coli</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	3,12 ^a
<i>S. sonnei</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	3,12 ^a
<i>K. pneumoniae</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	4,22 ^a
<i>C. albicans</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	10,3 ^b
<i>C. tropicalis</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	10,3 ^b
<i>S. cerevisiae</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	5,15 ^b
<i>C. neoformans</i>	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	> 1000	-

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: ^a Cloranfenicol; ^b Nistatina; EBF: extrato bruto folha; FHF: fração hexano folha; FCF: fração cloroformio folha; FAEF: fração acetato etila folha; EBC: extrato bruto casca; FHC: fração hexano casca; FCC: fração cloroformio casca; FAEC: fração acetato etila casca; Afror: afrormosina, Fujik: fujikinetina.

Dado ao fato de que as bactérias e fungos testados no experimento são facilmente combatidos com antibióticos comuns, e serem os mais comumente causadores de infecções leves, consideram-se os extratos da espécie como não potencial para estudos microbiológicos mais aprofundados. No entanto, justifica a continuidade do estudo para atividades alelopáticas e antineoplásicas, bem como a toxicidade *in vivo*, como serão avaliadas nos próximos tópicos.

Conforme citato na revisão da literatura, o gênero *Dalbergia* possui um número significativo de estudos quanto as suas propriedades antibacterianas e

antifúngicas. No entanto, não é possível estabelecer uma comparação direta entre eles, visto que além das espécies serem distintas, as partes das plantas, os métodos e os líquidos extratores utilizados, assim como as cepas bacterianas avaliadas, são diferentes daquelas aqui testadas.

4.6 ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS

A atividade antiproliferativa foi testada utilizando a metodologia descrita pelo Programa de Terapêutica do Desenvolvimento NCI / NIH. (MONKS et al., 1991). Esta metodologia visa à avaliação da amostra em muitas linhas de células tumorais diferentes para evidenciar um perfil antiproliferativo da amostra selecionada. A fim de priorizar avaliações químicas adicionais, o limite de valores de $IC_{50} \leq 30 \mu\text{g/mL}$ foi estabelecido segundo a literatura. (SUFFNESS e PEZZUTO, 1990; ITARATH et al., 2004).

Os resultados do teste da atividade antiproliferativa contra as células do tumor humano estão apresentados na TABELA 13. De todas as amostras testadas, a mistura Fujikinetina e Afrormosina (1:3), mostrou forte atividade frente a todas as linhagens, com valores de IC_{50} de 3,4 $\mu\text{g/ml}$ (U251), 7,3 $\mu\text{g/ml}$ (NCI-ADR / RES), 6,5 $\mu\text{g/ml}$ (786-0), 6,3 $\mu\text{g/ml}$ (OVCAR-3), 4,7 $\mu\text{g/ml}$ (HT-29). As frações clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas também demonstraram atividade.

Existem na literatura estudos de citotoxicidade acerca da afrormosina, entre eles estão a atividade antiproliferativa em células carcinogênicas em ratos (KONOSHIMA et al., 1992), indutora da expressão gênica em células de carcinoma mamário e endometrial humano (HALABALAKI et al., 2006) e atividade contra o bloqueio neuromuscular do veneno de *Bothrops jararacussu*. (PUEBLA et al., 2010). Muitos flavonoides têm sido identificados de várias espécies de *Dalbergia* e suas atividades contra a proliferação de vários tipos de células tumorais têm sido relatada, como a *D. odorifera* (PARK et al., 1995; CHOI et al., 2009; WANG et al., 2014), *D. olivari* (ITO et al., 2003a; ITO et al., 2003b), *D. parviflora* (SONGSIANG et al., 2009; SONGSIANG et al., 2011), *D. spinosa* (BALA et al., 2011; SAHA et al., 2013), *D. vaccineiifolia* (INNOCENT et al., 2010) e *D. oliveri* (DEESAMER et al., 2007).

TABELA 13 - RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIPROLIFERATIVA DAS AMOSTRAS DE *D. brasiliensis*

Substâncias testadas	IC 50 (µg/ml)				
	U251 (glioma,SNC)	NCI-ADR/RES (ovário)	786-0 (rim)	OVCAR-3 (ovário)	HT-29 (cólon)
EBC	332,5	121,4	136,2	127,6	133,2
HFC	456,3	388,4	321,2	333,2	398,1
FCC	33,2	31,4	28,9	21,5	23,3
FAEC	26,2	21,3	23	18,1	16,2
EBF	332,1	321,4	228,1	212,6	187,2
FHF	345,3	378,1	329,2	298,1	267,3
FCF	28,7	23,4	25,6	18,8	12,5
FAEF	13,4	17,2	14,3	23,4	22,1
Afrormosina Fujikinetina	3,4	7,3	6,5	6,3	4,7
Doxorubicina	0,036	1,1	0,25	0,28	0,27

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: EBF: extrato bruto folha; FHF: fração hexano folha; FCF: fração cloroformio folha; FAEF: fração acetato etila folha; EBC: extrato bruto casca; HFC: fração hexano casca; FCC: fração cloroformio casca; FAEC: fração acetato etila casca; IC₅₀: concentração inibitória de 50%

Algumas drogas podem alterar a adesão celular, embora sem matar a célula. (PAPAZISIS et al., 1997). Portanto, um produto natural que é capaz de inibir a adesão de células cancerosas é de extrema importância, uma vez que iria impedir a formação de tumores. A *D. brasiliensis* e seus constituintes, apesar de serem inativos nos testes de citotoxicidade realizados (*Artemia salina*, atividade hemolítica e antimicrobiana) inibiram a proliferação de células neoplásicas. Estes resultados sugerem a aplicabilidade da espécie como um fármaco antitumoral, já que a busca por novos fármacos nesta área, que desenvolvam menos efeitos tóxicos, é constante.

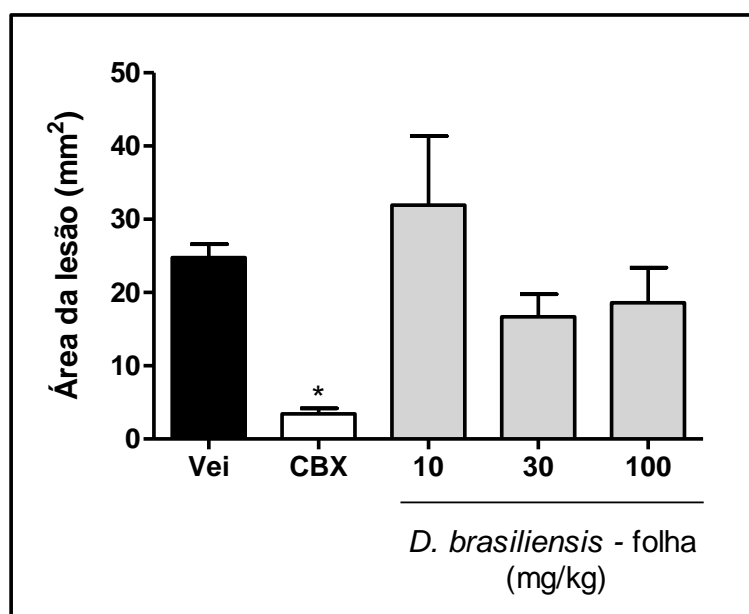
4.7 AVALIAÇÃO GASTROPROTETORA

4.7.1 Avaliação do extrato bruto em lesão gástrica induzida por etanol

Avaliou-se a atividade do EB das folhas e das cascas nas lesões gástricas induzidas por etanol nos camundongos. A administração do etanol acidificado por v.o. produziu lesões que comprometeram 24,8 mm² da mucosa gástrica nos animais do grupo controle.

O pré-tratamento dos animais com o EB das folhas, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, v.o., 1 hora antes da administração do etanol, não inibiu a lesão conforme demonstrado na FIGURA 39.

FIGURA 39 - EFEITO DO EB DAS FOLHAS DA *D. brasiliensis* SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL



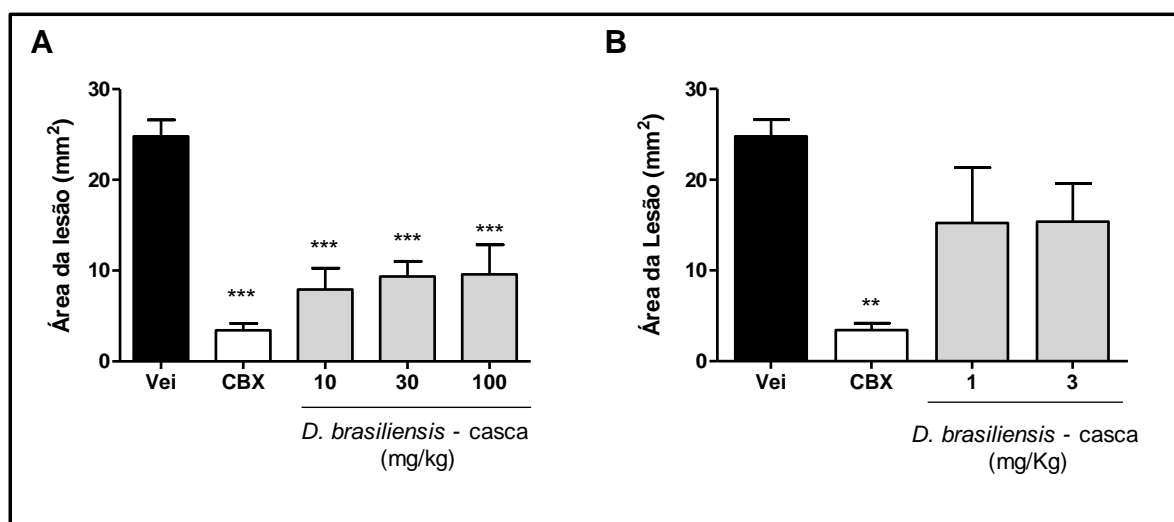
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB das folhas da *D. brasiliensis* dose 10, 30 e 100 mg/kg v.o., sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol (0,5 ml/200 g, v.o.) em camundongos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média da área gástrica lesionada de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H₂O + Tween® 80 0,1 mL/ kg), indica o grupo controle negativo, coluna CBX ao medicamento padrão carbenoxolona (200 mg/kg, v.o.). Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

Resultados mais efetivos foram obtidos ao avaliar o EB das cascas. O pré-tratamento com EB, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, reduziu significativamente o aparecimento de lesões na mucosa gástrica, com inibição de 68%, 62,3% e 61,4%

respectivamente. Foram consideradas estatisticamente iguais ($p^{***}<0,001$) ao medicamento carbenoxolona, utilizado como controle positivo, conforme demonstrado na FIGURA 40. O experimento também foi realizado com doses menores, 1 e 3 mg/kg, a fim de encontrar a menor dose efetiva do EB. No entanto, a dose de 10 mg/kg foi considerada a dose mínima efetiva do extrato.

FIGURA 40 - EFEITO DO EB DAS CASCA DA *D. brasiliensis* SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL



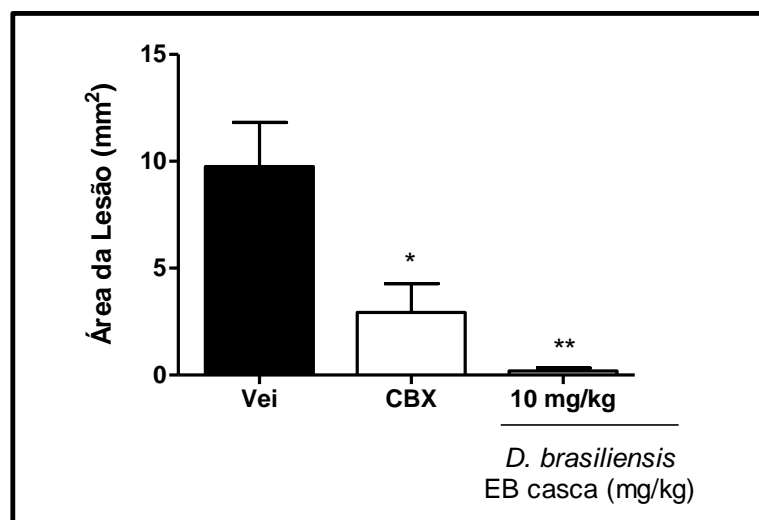
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB das cascas da *D. brasiliensis* dose 10, 30 e 100 mg/kg (Painel A) e 1 e 3 mg/kg (Painel B), v.o., sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol (0,5 ml/200 g, v.o.) em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média da área gástrica lesionada de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H₂O + Tween® 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo, coluna CBX ao medicamento padrão carbenoxolona (200 mg/kg, v.o.). Asteriscos denotam $p^{**}<0,01$ e $p^{***}<0,001$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.2 Avaliação do extrato bruto em lesão gástrica induzida por indometacina

Utilizando a dose mínima efetiva do EB da casca, 10mg/kg, encontrada no experimento anterior (lesões induzidas por etanol), investigou-se a atividade em lesões gástricas induzidas pelo anti-inflamatório não esteroide indometacina. O resultado, conforme FIGURA 41, demonstrou que o EB foi capaz de reduzir 98% das úlceras induzidas pelo medicamento. A atividade foi mais significativa que o padrão carbenoxolona, quando comparadas ao grupo controle negativo ($9,7 \pm 2$) mm².

FIGURA 41 - EFEITO DO EB DAS CASCA DA *D. brasiliensis* (10mg/kg) SOBRE AS LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR INDOMETACINA



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito dos EB da casca da *D. brasiliensis* dose 10 mg/kg, v.o., sobre as lesões gástricas agudas induzidas por indometacina (80 mg/mL, v.o.) em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média da área gástrica lesionada de 6 animais, sendo que a coluna Vei indica o veículo (H_2O + Tween® 80 0,1 mL/ kg) como controle negativo e CBX a carbenoxolona (200 mg/mL), controle positivo. Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ e $p^{**} < 0,01$ quando comparado com o grupo controle Vei (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

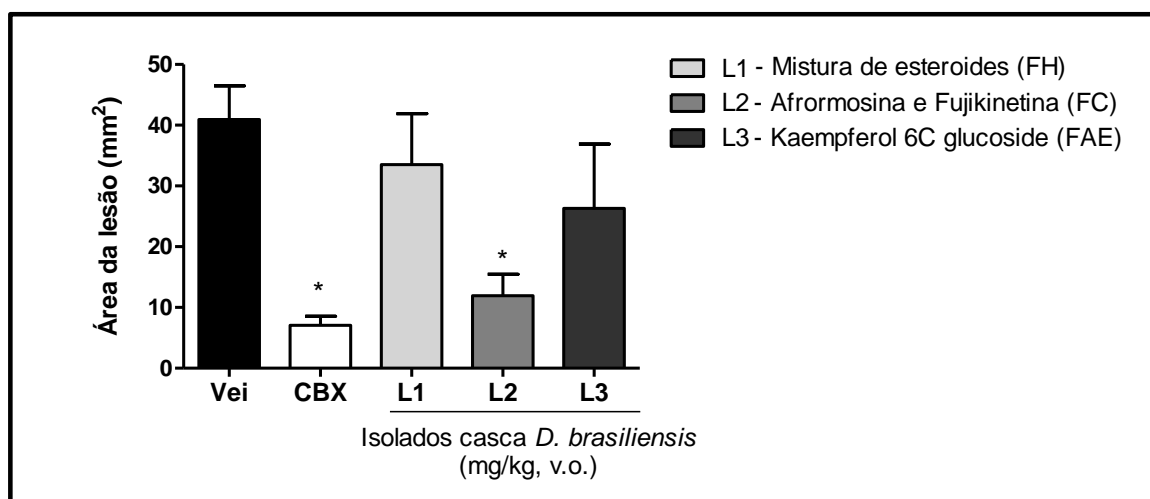
4.7.3 Avaliação dos isolados da casca na lesão gástrica induzida por etanol

Com objetivo de investigar a origem da atividade gastroprotetora proveniente da casca da *D. brasiliensis*, conforme demonstrado nos experimentos anteriores, avaliou-se a atividade de três isolados da casca em lesões induzidas por etanol.

O primeiro composto, L1, corresponde a uma mistura de esteroides isolados da fração hexano; colesterol, β sitosterol, estigmasterol, campesterol e stigmata 22 25 dien 3 ol. O composto L2, corresponde a mistura de fujikinetina e afrormosina (proporção 1:3), isolados da fração clorofórmio. E o composto L3: correspondente ao Kamferol-6-C-glucosídeo, isolado da fração acetato de etila da casca. Suas doses; 0,03 mg/kg, 0,01 mg/kg e 0,02 mg/kg, respectivamente; foram calculadas de acordo com o rendimento destes em relação a fração e a dose efetiva em promover gastroproteção do extrato (10 mg/kg).

O L2, afrormosina e fujikinetina, mostrou melhor atividade, pois foi capaz de reduzir 70% das úlceras, conforme FIGURA 42, quando comparado com o veículo ou controle negativo ($7,04 \pm 1,5$) mm².

FIGURA 42 - EFEITO DOS ISOLADOS DA CASCA DE *D. brasiliensis* EM ÚLCERAS INDUZIDAS POR ETANOL



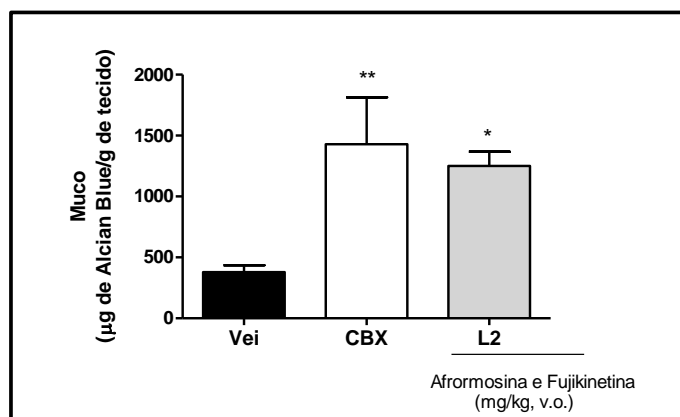
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito dos isolados (L1,L2,L3) das cascas da *D. brasiliensis* nas doses 0,03, 0,01 e 0,02 mg/kg respectivamente, v.o., sobre as lesões gástricas agudas induzidas por etanol (0,5 ml/200 g, v.o.) em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média da área gástrica lesionada de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H₂O + Tween® 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo, coluna CBX ao medicamento padrão carbenoxolona (200 mg/kg, v.o.). Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.4 Quantificação do muco gástrico

Com o objetivo de avaliar a atividade antissecretora, foi mensurado o muco gástrico produzido pela administração v.o. da mistura afrormosina e fujikinetina no experimento das úlceras induzidas pelo etanol. Os animais tratados com o veículo apresentaram uma média de 378 μ g/g de tecido, enquanto aqueles tratados com o carbenoxolona e com a mistura de isolados, 1429 e 1250 μ g/g de tecido respectivamente, demonstrando um aumento significativo de muco aderido à mucosa (FIGURA 43).

FIGURA 43 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA QUANTIFICAÇÃO DO MUCO GÁSTRICO NAS LESÕES POR ETANOL



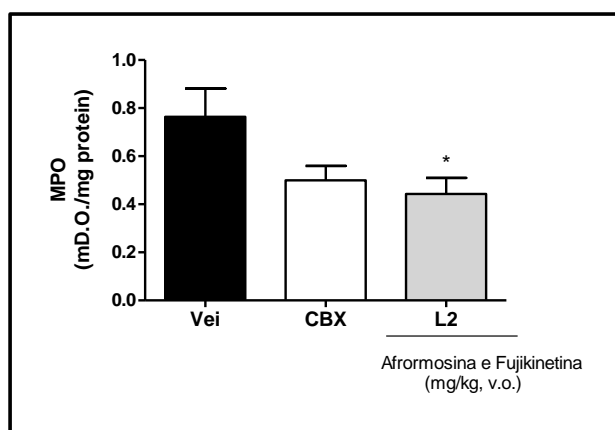
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do isolado L2, dose 0,01 mg/kg, v.o., na quantificação do muco gástrico nas lesões por etanol em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: soro fisiológico+ Tween® 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo e coluna CBX, o medicamento carbenoxolona, controle positivo. Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ e $p^{**} < 0,01$ quando comparado com o grupo Vei (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.5 Determinação da mieloperoxidase (MPO)

Avaliando o efeito da afrormosina e fujikinetina sobre a enzima MPO, observou-se que o tratamento com o CBX e com os isoflavonoides reduziram a atividade da enzima em 35% e 43% respectivamente, em relação ao controle negativo. O isolado apresentou resultado mais significativo que o CBX (FIGURA 44).

FIGURA 44 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DA MPO EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do isolado L2, dose 0,01 mg/kg, v.o., na determinação de MPO em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H₂O + Tween 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo e coluna CBX, controle positivo, o medicamento carbenoxolona. Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ quando comparado com o grupo controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

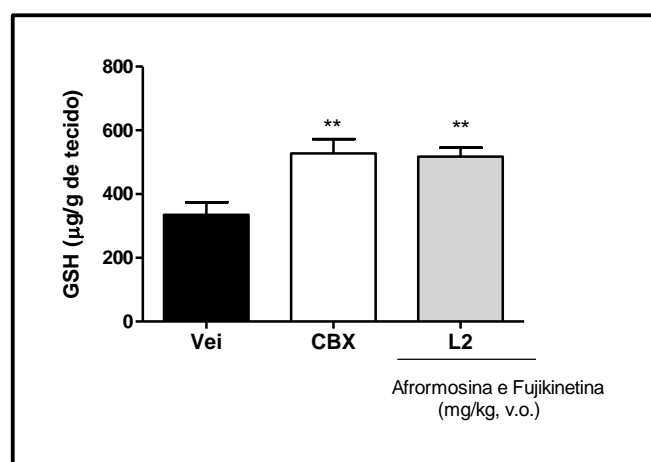
5.7.6 Efeito dos isolados nos indicadores do estresse oxidativo

Avaliou-se os efeitos dos isoflavonoides afrormosina e fujikinetina sobre os níveis de grupos sulfídricos não proteicos (GSH) e hidroperóxidos lipídicos (LOOH) na região da lesão gástrica.

4.7.6.1 Quantificação dos grupos sulfídricos não proteicos (GSH)

No intuito de saber se a manutenção dos níveis de GSH está envolvido na ação cicatrizante gástrica da afrormosina e fujikinetina, os níveis de GSH foram avaliados em amostras de estômagos previamente ulcerados com etanol. A FIGURA 45 mostra que o nível de GSH no estômago dos animais ulcerados que receberam o veículo (335 ± 39 μg /g de tecido) é menor que os animais que receberam a carbenoxolona e os isoflavonoides, (527 ± 44) e (517 ± 27) μg /g de tecido respectivamente, considerados iguais estatisticamente.

FIGURA 45 – EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DE GSH EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL



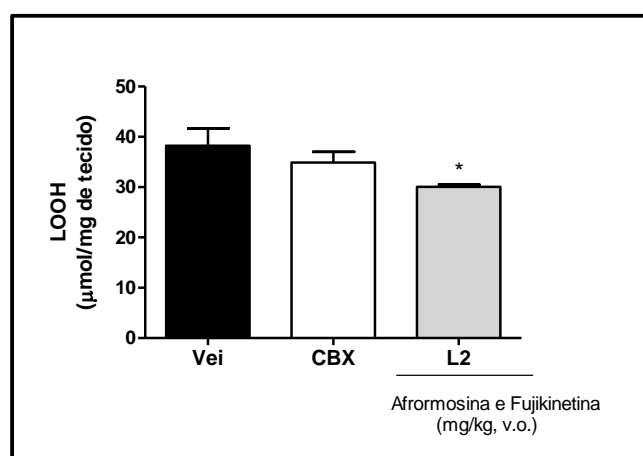
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do isolado L2, dose 0,01 mg/kg, v.o., na determinação de GSH (μg /g de tecido) em úlceras por etanol em camundongos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H_2O + Tween 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo e coluna CBX, o medicamento carbenoxolona, controle positivo. Asteriscos denotam $p^{**} < 0,01$ quando comparado com o grupo controle negativo (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.6.2 Determinação dos hidroperóxidos lipídicos (LOOH)

Avaliando o efeito da afrormosina e fujikinetina sobre LOOH, observamos que o tratamento com o CBX e com os isoflavonoides reduziram os níveis de LOOH em $(34,9 \pm 2,1)$ e $(30 \pm 0,42)$ mmol/mg de tecido respectivamente, em relação ao controle negativo $(38,2 \pm 3,4)$ mmol/mg, conforme FIGURA 46 .

FIGURA 46 - EFEITO DA AFRORMOSINA E FUJIKINETINA NA DETERMINAÇÃO DE LOOH EM LESÕES GÁSTRICAS INDUZIDAS POR ETANOL



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do isolado L2, dose 0,01 mg/kg, v.o., na determinação de LOOH (μmol/mg de tecido) em camundongos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna Vei (veículo: H₂O + Tween 80 0,1mL/kg) indica o grupo controle negativo e a coluna CBX, o controle positivo, medicamento carbenoxolona. Asteriscos denotam $p^* < 0,05$ quando comparado com o grupo controle (ANOVA de uma via seguida pelo teste de Bonferroni).

4.7.7 Discussão da atividade gastroprotetora

O etanol é um dos mais intensos agentes agressores da mucosa gástrica, causando uma redução na produção de muco e da secreção de bicarbonato, exercendo um efeito tóxico diretamente no epitélio, que induz a formação de lesões necróticas características, além do aparecimento de radicais livres e isquemia (HIRUMA-LIMA et al., 2000; HIRUMA-LIMA et al., 2009; MASSIGNANI et al., 2009).

Avaliou-se a atividade do extrato bruto (EB) das folhas e das cascas nas lesões gástricas induzidas por etanol nos camundongos. A administração do etanol acidificado por v.o. produziu lesões que comprometeram 24,8 mm² da mucosa gástrica nos animais do grupo controle. O pré-tratamento dos animais com o EB das folhas da *D. brasiliensis*, diminuiu a lesão, mas não foi significativo estatisticamente

(FIGURA 39). Resultados mais efetivos foram obtidos com EB das cascas, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, que reduziram significativamente o aparecimento de lesões na mucosa gástrica, com inibição de 68%, 62,3% e 61,4% respectivamente, e foram consideradas estatisticamente iguais ao medicamento padrão carbenoxolona. O experimento também foi realizado com doses menores, 1 e 3 mg/kg, a fim de encontrar a menor dose efetiva do EB (FIGURA 40).

A atividade antiulcerogênica já foi estudada no extrato aquoso de *Dalbergia monetaria* e mostrou inibição significativa e dose-dependente das lesões gástricas induzidas por etanol (41%), estresse (40%) e ligadura de piloro (46%). Nas lesões por indometacina não houve inibição. O extrato aumentou a síntese de PGE₂ da mucosa gástrica em comparação com o controle ($89,7 \pm 21,5$ e $52,6 \pm 11,8$ pg/mg respectivamente) e reduziu o teor de ácido do suco gástrico mas sem modificar o pH. O autor sugere que o mecanismo envolvido na redução das lesões, produzido pelo extrato de *D. monetaria*, pode estar relacionado com a sua propriedade de inibir a produção de histamina. (COTA et al., 2010).

Considerando os resultados no modelo de úlcera induzida por etanol, o EB também foi testado no modelo de lesão gástrica induzido por indometacina. O uso de anti-inflamatórios não esteroidal (AINEs) é um dos fatores exógenos agressores da mucosa gástrica. Os efeitos terapêuticos dos AINEs são mediados pela inibição da isoforma do tipo 2 da enzima cicloxigenase (COX-2), que está envolvida diretamente na patogênese da dor, febre e inflamação. (ROBBINS, 2013). Porém, a inibição da isoforma do tipo 1 da COX (COX-1) causada pela administração de AINEs não seletivos, como a indometacina, promove a redução dos níveis de PGE₂ e conseqüentemente os níveis de muco aderido à mucosa gástrica, um importante fator de proteção da mucosa, também são reduzidos. Devido a esse fato, o uso prolongado desses fármacos está associado ao surgimento de lesões gástricas ou ao agravamento de lesões já existentes. (JONES et al., 1999; HALTER 2001). Experimentalmente, a indometacina, em uma dose adequada, também é uma ferramenta para estudos de substâncias com atividade antiúlcera.

Para avaliar o efeito do EB da casca em lesões gástricas induzidas pela indometacina, utilizou-se a dose mínima efetiva, 10 mg/mL, encontrada no experimento das lesões induzidas por etanol. O EB foi capaz de reduzir 98% das úlceras induzidas pelo medicamento (FIGURA 41), confirmando o efeito

gastroprotetor. A atividade foi mais significativa que o padrão carbenoxolona, quando comparadas ao grupo controle ($9,7 \pm 2\text{mm}^2$).

Os efeitos colaterais dos AINEs não seletivos são classicamente atribuídos à sua capacidade de inibição da COX-1 e como consequência uma diminuição da síntese das prostaglandinas, que são responsáveis pela modulação de vários componentes envolvidos na defesa da mucosa gástrica. (KONTUREK, 2005). Deste modo, perante os resultados obtidos, é possível que um dos mecanismos envolvidos na gastroproteção exercida pelo EB poderia estar relacionado à síntese ou a disponibilidade de prostaglandinas na mucosa gástrica, porém, experimentos são necessários para confirmar tal hipótese.

Apesar de AINES e etanol atuarem por mecanismos distintos na indução de lesões gástricas, eles têm em comum a consequência de induzir estresse oxidativo e diminuir fatores protetores da mucosa. O estresse oxidativo pode causar danos severos às células da mucosa, induzindo processo de morte celular. (BANDYOPADHYAY et al., 2002; KAPLAN et al., 2012). Neste sentido, substâncias com propriedade antioxidante podem colaborar para a proteção do tecido estomacal. A capacidade antioxidante *in vitro* da *D. brasiliensis* já foi relatada por Dalarmi et al. (2017) demonstrando um grande potencial sequestrador de radical livre principalmente nas frações clorofórmio e acetato de etila.

Com objetivo de investigar a origem da atividade gastroprotetora proveniente da casca da *D. brasiliensis*, avaliou-se a atividade de isolados da casca em lesões induzidas por etanol. O primeiro (L1), corresponde a uma mistura de esteroides isolados da fração hexano; colesterol, β -sitosterol, estigmasterol, campesterol e stigmata-22-25-dien-3-ol. O segundo (L2), corresponde a mistura de fujikinetina e afrormosina (1:3), isolados da fração clorofórmio. E o terceiro (L3): corresponde ao Kamferol-6-C-glucosideo, isolado da fração acetato de etila da casca. A mistura fujikinetina e afrormosina mostrou melhor atividade, pois reduziu em 70% as úlceras (FIGURA 42), quando comparado grupo controle. Os flavonoides possuem a capacidade de aumentar o conteúdo local de prostaglandinas, diminuir a secreção ácida e o estresse oxidativo. (BORRELLI; IZZO, 2000).

O muco gástrico é a primeira barreira de defesa da mucosa contra a secreção ácida devido à formação de um gel viscoso, elástico e aderente. (LAINE, 2008). Essa camada de muco evita os danos causados pelo contato das células epiteliais

com o ácido clorídrico da luz estomacal. (MOJZIS; HEGEDUSOVA; MIROSSAY, 2000; NAM et al., 2005; WALLACE, 2007). Com o objetivo de avaliar a atividade antissecretora, foi mensurado o muco gástrico produzido pela administração da fujikinetina e afrormosina. Os animais tratados com os isoflavonoides apresentaram um aumento significativo de muco aderido a mucosa gástrica (FIGURA 43).

Existe uma relação muito estreita entre a inflamação e a cicatrização gástrica. (HARTET, 1998). Um dos fatores que ocorrem durante o processo inflamatório na mucosa gástrica é a ativação de leucócitos, que causam um aumento no consumo de O₂ para a produção de ânions superóxidos, um radical livre precursor de várias espécies reativas de oxigênio. (HARTET, 1998). Conforme Hamaishi (2006), o surgimento de radicais livres induzidos pelos neutrófilos, pode ser um fator crucial para a formação de lesões gástricas. Estes compostos podem provocar danos celulares, pois não possuem estabilidade, podendo se associar com outras estruturas como lipídios da membrana, proteínas e DNA. (HELLOU, 2012). Sendo assim, a ativação e a infiltração de neutrófilos promove um desequilíbrio no balanço oxidativo e na microcirculação, contribuindo para o retardo da cicatrização gástrica. (BOU-ABBOUD et al., 1998).

A atividade da MPO é classicamente utilizada para a mensuração indireta da infiltração de neutrófilos em diferentes tecidos, pois esta enzima está presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos. (NISHIDA, 1997; POTRICH, 2010). Dessa forma, é considerada um marcador de inflamação. Como observado em nossos resultados, avaliando o efeito da fujikinetina e afrormosina sobre a enzima MPO, o tratamento reduziu a atividade da enzima em 43%, em relação ao controle negativo. Os isoflavonoides apresentaram resultado mais significativo que o medicamento padrão carbenoxolona, com 35% de inibição (FIGURA 44). Resultados similares foram obtidos por Lopes et al. (2013) que isolou a afrormosina da *Amburana cearenses*, e estudou sua atividade anti-inflamatória. Segundo o autor, afrormosina inibiu em até 75% a atividade da MPO, tal atividade foi superior ao medicamento padrão utilizado, a indometacina, que obteve 71% de inibição.

A hidroperoxidação de lipídios da membrana plasmática resulta na liberação de componentes intracelulares, tais como enzimas lisossomais, que contribuem para o desenvolvimento da lesão. (DEMIR et al., 2003). Porém, os animais tratados com os isoflavonoides também reduziram os níveis de LOOH significativamente em

relação ao grupo veículo, novamente, resultado mais efetivo que o medicamento padrão (FIGURA 46).

Os dois principais meios de defesa antioxidantes no organismo podem ser divididos em dois grupos, enzimáticos e não enzimáticos. Os sistemas não enzimáticos envolvem a glutathiona, um tripeptídeo que existe no organismo em suas formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG). (JÚNIOR et al., 2001). Efetivamente, GSH participa diretamente como um potente antioxidante e indiretamente como substrato para enzimas antioxidantes como glutathiona oxidase (GO), glutathiona peroxidase (GPx) e glutathiona redutase (GR). (CNUBBEN et al., 2001). Os resultados do tratamento com os isoflavonoides e com a carbenoxolona demonstraram elevar os níveis da glutathiona reduzida (GSH) em relação ao veículo (FIGURA 45), no entanto, não é possível avaliar se isto ocorreu pelo aumento do peptídeo no tecido ou pelo seu aumento na forma oxidada, o que poderia ser atestado avaliando-se os níveis de GSSH e das enzimas GPx e GR não exploradas neste trabalho.

Os resultados da atividade gastroprotetora sugerem que a prevenção da úlcera com a administração dos constituintes da *D. brasiliensis* pode estar envolvido por meio da eliminação de radicais livres.

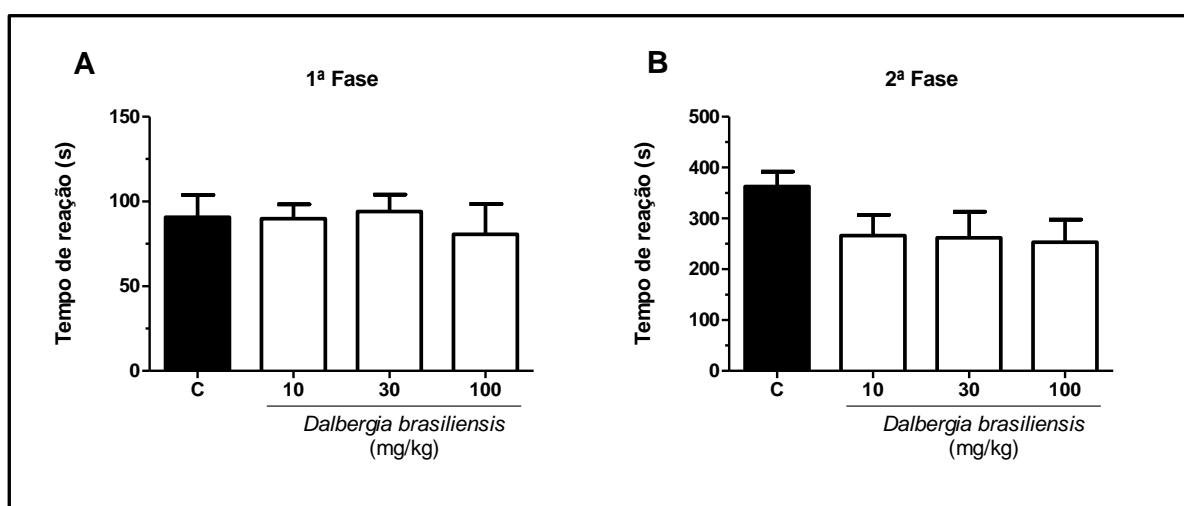
Em conjunto, todos os dados levantados sobre a atividade gastroprotetora da espécie, atestam um grande potencial do seu efeito, uma vez que seu mecanismo de ação combina um efeito protetor da mucosa gástrica com efeito antioxidante e inibição de migração de neutrófilos favorecendo a cicatrização gástrica. Entretanto, não pode ser excluída a possibilidade de outros mecanismos envolvidos no processo de gastroproteção que não foram avaliados neste estudo, e, estudos adicionais ainda precisam ser realizados para afirmar a atividade. No entanto, os achados deste trabalho, demonstram um grande potencial terapêutico gastroprotetor e cicatrizante gástrico dos constituintes da casca da *D. brasiliensis*.

4.8 AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

4.8.1 Nociceção induzida por formalina

O teste da formalina foi utilizado para avaliação inicial de possíveis efeitos antinociceptivos do extrato bruto (EB) das folhas da *D. brasiliensis*. Nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, o EB não foi capaz de diminuir o comportamento nociceptivo dos animais na 1ª fase (neurogênica). Na 2ª fase (inflamatória) houve uma diminuição do efeito nociceptivo, embora não significativa estatisticamente, quando comparado ao grupo controle, conforme demonstrado na FIGURA 47.

FIGURA 47 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* (DOSES BAIXAS) NA NOCICEÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA



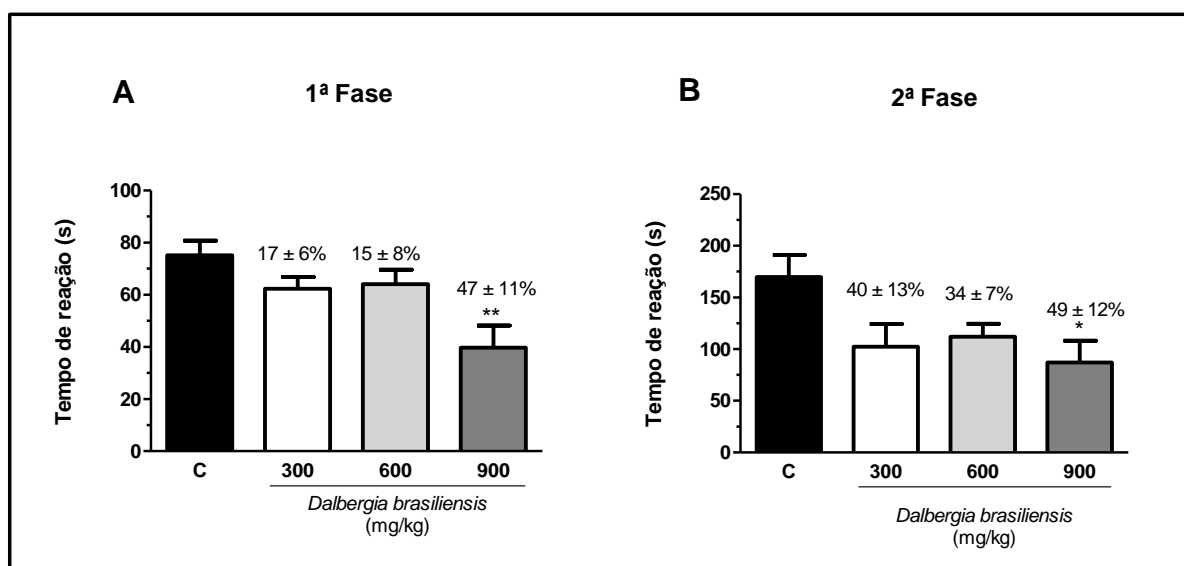
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Fase neurogênica (painel A) e fase inflamatória (painel B) da nociceção induzida por formalina. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 8 animais, sendo a coluna C indicativa do grupo controle negativo (soro fisiológico + Tween® 80 0,1mL/kg). Utilizou-se ANOVA de uma via seguida do teste de tukey.

Como os resultados não foram significativos, realizou-se o mesmo experimento com doses maiores do EB (300, 600, 900 mg/kg), conforme utilizado em estudos de nociceção com outras espécies do gênero *Dalbergia* pesquisado na literatura.

Com as doses de 300, 600, 900 mg/kg do EB da *D. brasiliensis*, houve uma diminuição do comportamento nociceptivo nas duas fases, embora a fase tardia obteve resultados mais efetivos. A maior dose (900 mg/kg) demonstrou significativos resultados nas duas fases, com uma inibição de (47 ± 11) % em relação ao controle, na fase inicial, e (49 ± 12) % na fase inflamatória (FIGURA 48).

FIGURA 48 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* (DOSES ALTAS) NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR FORMALINA



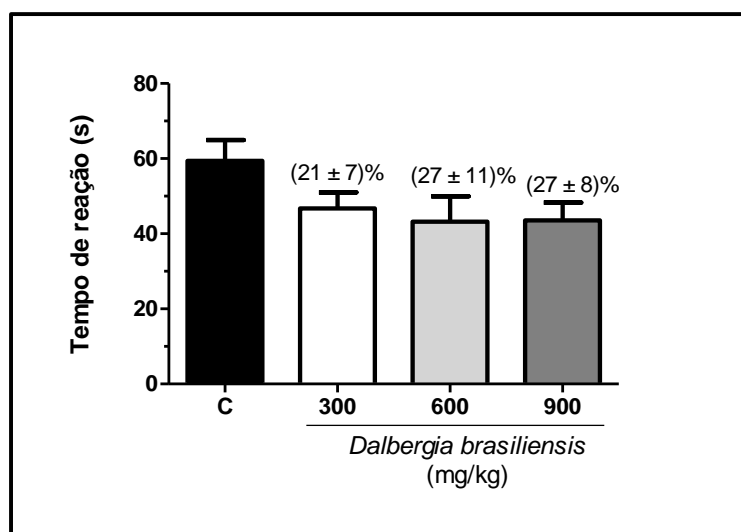
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Fase neurogênica (painel A) e fase inflamatória (painel B) da nocicepção induzida por formalina. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa do grupo controle negativo (soro fisiológico+Tween® 80 0,1mL/kg). Os níveis de significância são indicados por ** $p < 0,01$ quando comparados ao grupo controle. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida do teste de tukey e os valores indicados acima das colunas correspondem às inibições observadas.

4.8.2 Nocicepção induzida por ácido acético

Avaliou-se o efeito do EB nas doses 300, 600, 900 mg/kg no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético. Conforme demonstrado na FIGURA 49, o EB reduziu o número de contorções abdominais nos camundongos, embora não significativa, quando comparado ao grupo controle. Tal redução apresentou um perfil relacionado à dose, com uma inibição de $(21 \pm 8) \%$ na dose de 300 mg/kg, $(27 \pm 11) \%$ na dose de 600 mg/kg e $(27 \pm 8) \%$ na dose de 900 mg/kg.

FIGURA 49 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* NA NOCICEPÇÃO INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO



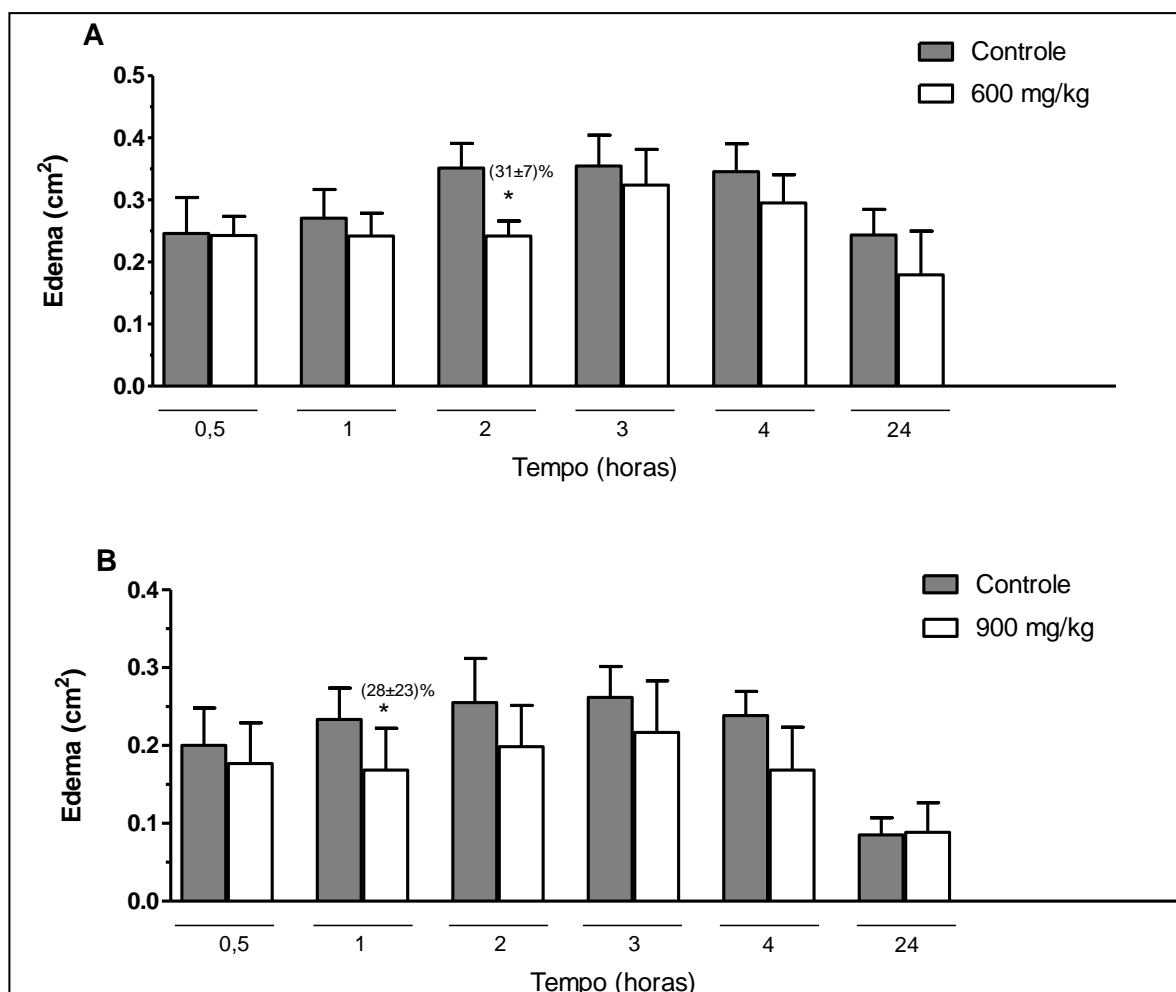
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito EB da casca nas doses de 300, 600, 900 mg/kg v.o. na nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos. Cada coluna representa a média ± erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (soro fisiológico+Tween® 80 0,1mL/kg). Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey e os valores acima correspondem ao valor de inibição relativo a cada dose.

4.8.3 Edema de pata induzido por carragenina

No experimento do edema de pata induzido pela carragenina, constatou-se que ambas as doses (600 e 900 mg/kg v.o.) previniu a formação do edema, durante todo o período de avaliação, quando comparadas com o grupo controle (FIGURA 50). Na dose de 600mg/kg, a diminuição máxima do edema foi de (31 ± 7) %, 2 horas após a administração do extrato; e com a dose de 900 mg/kg, foi de (28 ± 23) %, que ocorreu 1 hora após a administração do extrato.

FIGURA 50 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB de 600 mg/kg v.o. (painel A) e de 900 mg/kg v.o. (painel B) no edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Edema = (área da pata direita – área da pata esquerda) / área da pata esquerda, sendo que, área da pata (cm²) = altura da pata x largura da pata. Cada coluna representa a média ± erro padrão das médias de 6 animais, sendo que a primeira coluna de cada tempo indica os valores dos grupos controles (soro fisiológico+Tween 80 0,1mL/kg). Os níveis de significância são indicados por * p < 0,05 quando comparados ao grupo controle. A comparação entre os grupos foi realizada empregando-se teste t de Student.

4.8.4 Discussão da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva

O teste da formalina foi utilizado para avaliação inicial de efeitos antinociceptivos do EB das folhas da *D. brasiliensis*. A nocicepção induzida por formalina consiste na injeção intraplantar ou subcutânea desta substância. A resposta provocada pela formalina constitui-se de duas fases de nocicepção: uma fase inicial e uma tardia, que parecem envolver mediadores químicos diferentes. (TJOLSEN e HOLE, 1997; SANTOS et al., 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

A fase inicial é caracterizada pela dor de origem neurogênica causada pela estimulação química direta dos nociceptores das fibras sensoriais aferentes, principalmente fibras do tipo C e está associada a liberação de aminoácidos excitatórios, ácido nítrico e substância P. A fase tardia é representada pela dor de origem inflamatória e está relacionada com a liberação de mediadores pró-inflamatórios como bradicinina, prostaglandina, serotonina, entre outros. A dor nesta fase é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinal e central. (TJØSEN et al., 1992; TJØLSEN e HOLE, 1997). Vários trabalhos têm demonstrado que a administração intraplantar de formalina em roedores produz significativo aumento dos níveis espinais de diferentes mediadores como aminoácidos excitatórios, neuropeptídeos, PGE2, óxido nítrico e cininas. (MALMBERG e YARSH, 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1998; OMOTE et al., 1998).

A *D. brasiliensis* apresentou uma diminuição do comportamento nociceptivo nas duas fases (FIGURA 49). A maior dose (900 mg/kg) obteve resultado mais significativo, com uma inibição de 47% na fase inicial e 49% na fase inflamatória. Como na 2ª fase do experimento os resultados foram mais efetivos, acredita-se que esse efeito antinociceptivo tenha por mecanismo a interferência de mediadores inflamatórios. Na 2ª ocorre a liberação de mediadores pró-inflamatórios, ocorrendo a ativação de neurônios aferentes sensibilizados, devido à liberação anterior de mediadores neuroativos. (TJØLSEN e HOLE, 1997; SANTOS e CALIXTO, 1997; SANTOS et al., 1999; VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

Dando continuidade à investigação da atividade antinociceptiva do extrato, procedeu-se o ensaio de nocicepção induzida por injeção intraperitoneal de ácido acético. Este modelo experimental é utilizado para investigar a atividade anti-inflamatória e analgésica de novos produtos. Possui pouca especificidade, mas boa sensibilidade, sendo possível observar o efeito de substâncias sobre a dor visceral de origem inflamatória. (LE BARS et al., 2001).

Neste modelo, a administração de um agente irritante para membrana serosa, como o ácido acético, provoca comportamentos estereotipados em camundongos e ratos que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora. Estes comportamentos são considerados reflexos e evidenciam a dor visceral. (LE BARS et al., 2001). A irritação local, provocada pela

administração deste agente na cavidade intraperitoneal, desencadeia a liberação de vários mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, principalmente a PGE2, bem como algumas citocinas. (CORREA et al., 1996; RIBEIRO et al., 2000; IKEDA et al., 2001). Estes mediadores ativam nociceptores quimiosensíveis que contribuem com o desenvolvimento da dor de origem inflamatória.

Através da realização deste teste, foi possível observar que a administração sistêmica do EB da folha, diminuiu o número de contorções abdominais nos camundongos (FIGURA 49). Dessa forma, o resultado obtido, mesmo não sendo significativo estatisticamente, sugere que o efeito antinociceptivo do EB inibe a liberação de mediadores pró-inflamatórios, induzido pelo ácido acético.

O teste do edema de pata induzido por carragenina é um modelo experimental amplamente utilizado na investigação do efeito de drogas na fase aguda da inflamação. (POZHARITSKAYA et al., 2010). Este modelo é sensível a inibidores da ciclo-oxigenase, mas não a inibidores da lipoxigenase, sendo empregado na avaliação do efeito de anti-inflamatórios não-esteroidais, os quais inibem primeiramente a ciclo-oxigenase envolvida na síntese das prostaglandinas. (MASRESHA, MAKONNEN, e DEBELLA, 2012).

Avaliando os resultados do experimento edema de pata constatou-se que ambas as doses do EB provocaram diminuição da área do edema induzida pela carragenina nos camundongos durante todo o período avaliado (FIGURA 50). A dose de 600 mg/kg obteve o efeito significativo após 2 horas da administração, com 31% de inibição, e a dose de 900 mg/kg, inibiu 28% o edema após uma hora da administração do EB. Acredita-se que o extrato interferiu na liberação periférica de mediadores pró-inflamatórios que contribuem com a formação do edema na inflamação. Este resultado corrobora com os resultados da nocicepção induzida por formalina, o qual apresentou uma diminuição do tempo da lambida na pata na 2ª fase, fase inflamatória do experimento.

Avaliando o conjunto dos resultados obtidos, constatou-se que o extrato bruto das folhas da *D. brasiliensis* possui discreta ação antinociceptiva e anti-inflamatória, interferindo na liberação de mediadores inflamatórios, tornando interessante a continuidade do estudo em modelos de nocicepção mais específicos a fim de elucidar o mecanismo de ação. No entanto, de acordo com os constituintes isolados,

avaliações antioxidantes e farmacológicas realizadas e dados da literatura de outras espécies do gênero, acredita-se que os flavonoides presentes na espécie podem ser os responsáveis pela atividade anti-inflamatória identificada.

Muitas espécies do gênero *Dalbergia* são utilizadas na medicina tradicional como analgésicas e anti-inflamatórias e essas atividades farmacológicas já foram estudadas em várias espécies segundo a literatura. O extrato etanólico das folhas de *D. sissoo* diminuiu as contorções induzidas por ácido acético na dose de dose de 1000 mg/kg (inibição de $26,17 \pm 3,98\%$). (HAJARE et al., 2000). O extrato etanólico da casca de *D. lanceolaria* também mostrou atividade analgésica periférico e central em nocicepção induzida por ácido acético, formalina e na retirada da cauda em ratos nas doses 100, 200 e 400 mg/kg de forma dependente da dose. (MISAR et al., 2005). O extrato metanólico da casca de *D. spinosa* mostrou significativa atividade analgésica no modelo de contorção induzida por ácido acético com uma inibição de 40,01% na dose de 500 mg/kg. (RAIHAN et al., 2012). Resultado semelhante foi obtido com o extrato do espinhão da *D. spinosa*, o qual apresentou atividade significativa pelo mesmo teste com inibição de 33,34 e 63,89 % nas doses de 250 e 500 mg/kg. (BALA et al., 2011).

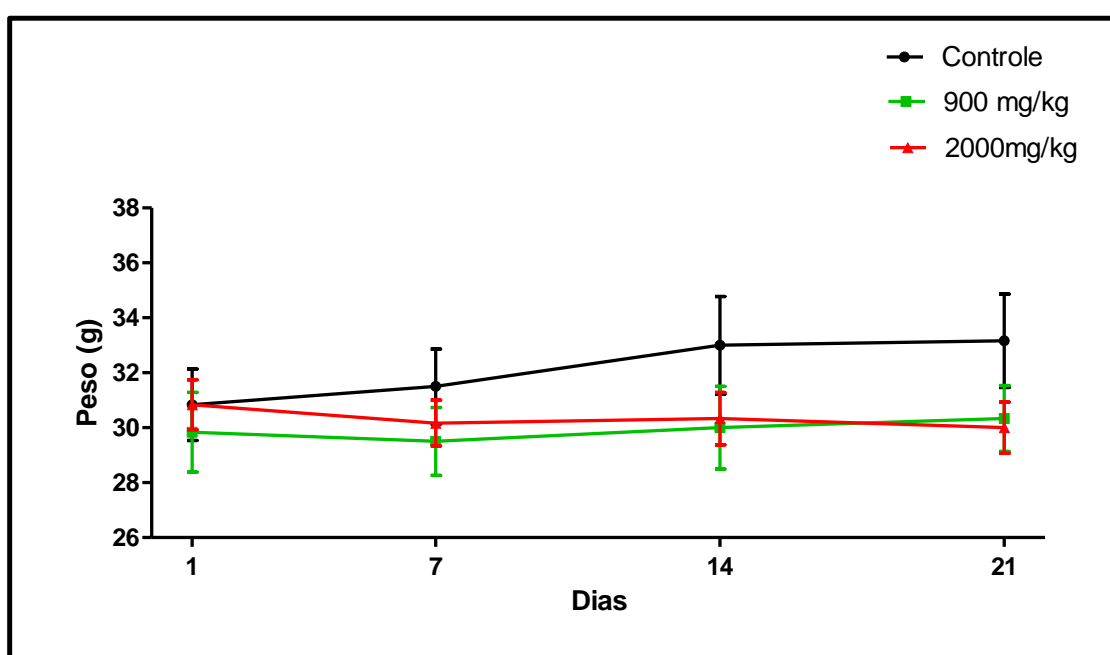
O ensaio do edema de pata induzido por carragenina também foi utilizado para investigar outras espécies de *Dalbergia*. A biochanina-A, isolado das flores de *D. sissooides* demonstrou 35,85% de inibição do edema na pata em comparação com o cetorolaco de trometamina (54,92%) (KAVIMANI et al., 1997); o extrato das folhas de *D. sissoo* diminuiu o edema nas doses 100 , 300 e 1000 mg/kg (com inibição de 29,55; 34,09 e 43,18 %) (HAJARE et al., 2001); extrato etanólico das cascas da *D. sissoo* mostrou efeito na dose 1000 mg/kg (ASIF et al., 2009); o extrato etanólico das cascas da *D. lanceolaria* na dose 400 mg/kg (KALE et al., 2007); o extrato metanólico das raízes de *D. sissoo* diminuiu o edema na dose 1000 mg/kg (KUMAR et al., 2010); o extrato metanólico das folhas da *D. paniculata* mostrou inibir o edema em 47,83 % na dose de 800 mg/kg. (GANGA et al., 2012).

4.9 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS TOXICOLÓGICOS

4.9.1 Peso do animal

Com objetivo de avaliar efeitos deletérios após 21 dias de tratamentos diários com o EB, nas doses 900 e 2000 mg/kg, foi avaliado o ganho ou perda de peso dos animais durante o período do experimento. Na FIGURA 51, observa-se um discreto aumento de peso do grupo controle durante o período dos 21 dias. Nos grupos tratados, não houve alteração. A diferença entre os grupos não foi considerada significativa estatisticamente.

FIGURA 51 - PESO DIÁRIO DURANTE OS 21 DIAS DE ADMINISTRAÇÃO DO EB DA *D.brasiliensis*



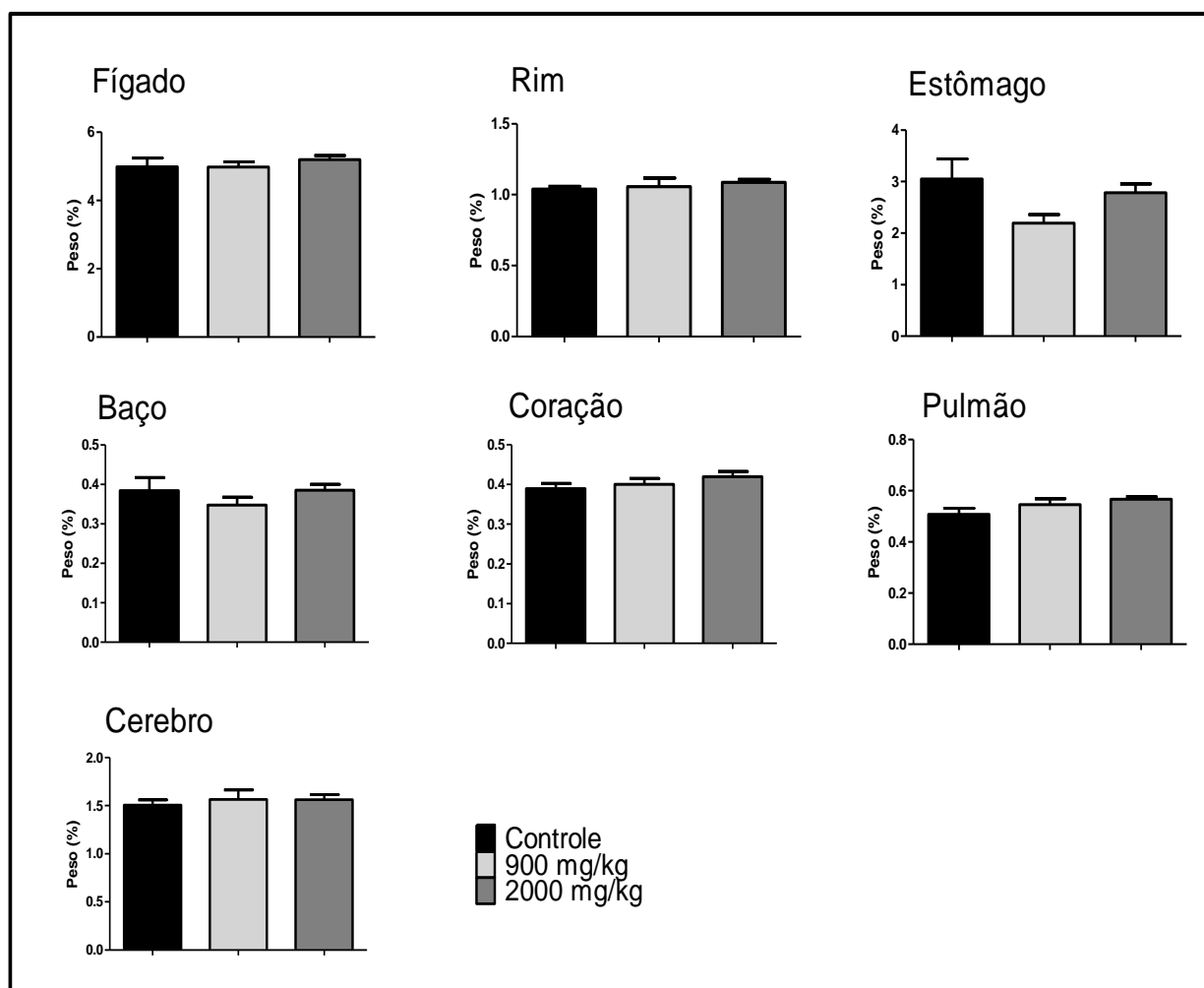
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeitos do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg v.o.) administrada diariamente (21 dias) no peso dos camundongos. Cada linha representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo que a linha em preto indica os valores do grupo controle negativo. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.2 Peso dos órgãos vitais

Com relação ao peso relativo dos órgãos vitais, não foram encontradas diferenças entre os pesos do fígado, rins, baço, coração, estômago, pulmão e cérebro, em relação aos pesos destes órgãos do grupo controle, conforme demonstra a FIGURA 52.

FIGURA 52 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA *D. brasiliensis* NO PESO RELATIVO DE ÓRGÃOS VITAIS



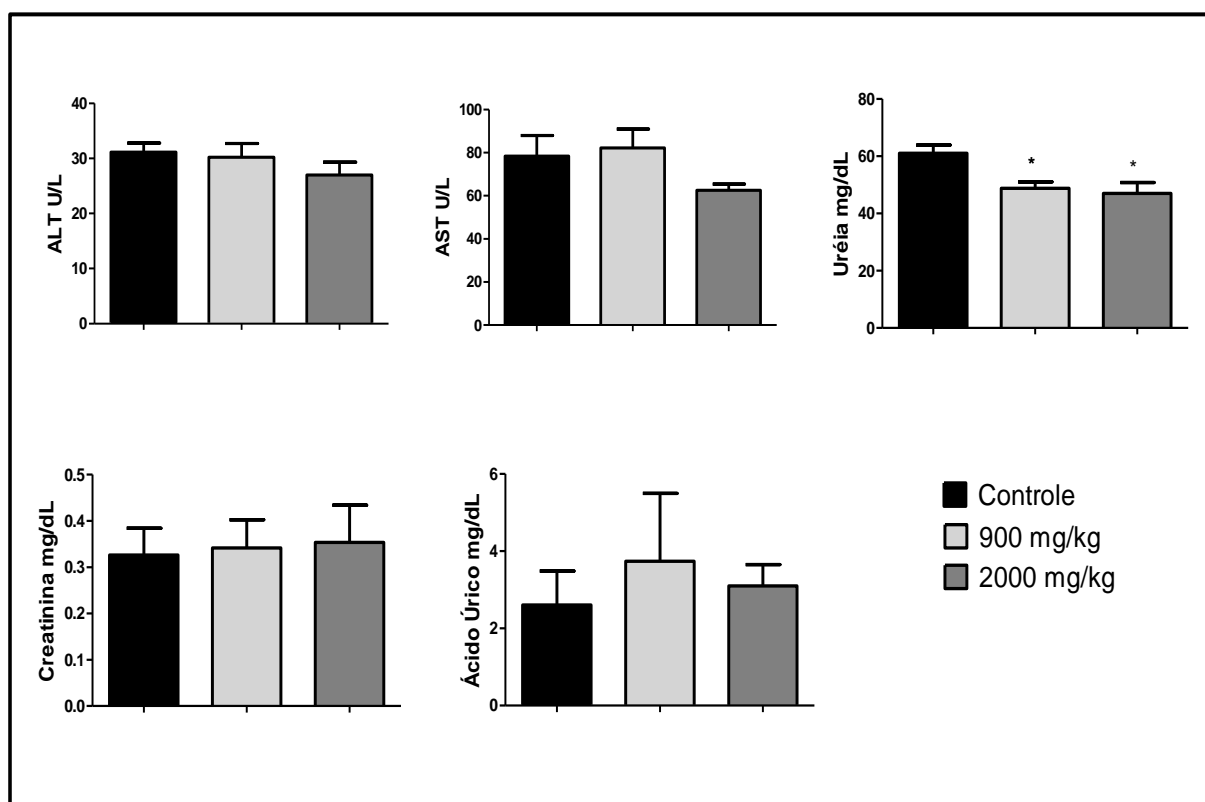
FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeitos do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg v.o.) administrada diariamente (21 dias) no peso relativo dos órgãos vitais. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo que a coluna C indica os valores do grupo controle negativo. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.3 Avaliação de parâmetros bioquímicos

Nos parâmetros bioquímicos avaliados após os 21 dias de administração do EB (900 e 2000 mg/kg) apenas a dosagem da uréia ocorreu diferença estatística em relação ao grupo controle. ALT, AST, ácido úrico e creatinina não apresentaram alteração significativa (FIGURA 53).

FIGURA 53 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA *D. brasiliensis* NAS DOSAGENS DE PARÂMETROS BIOQUÍMICOS



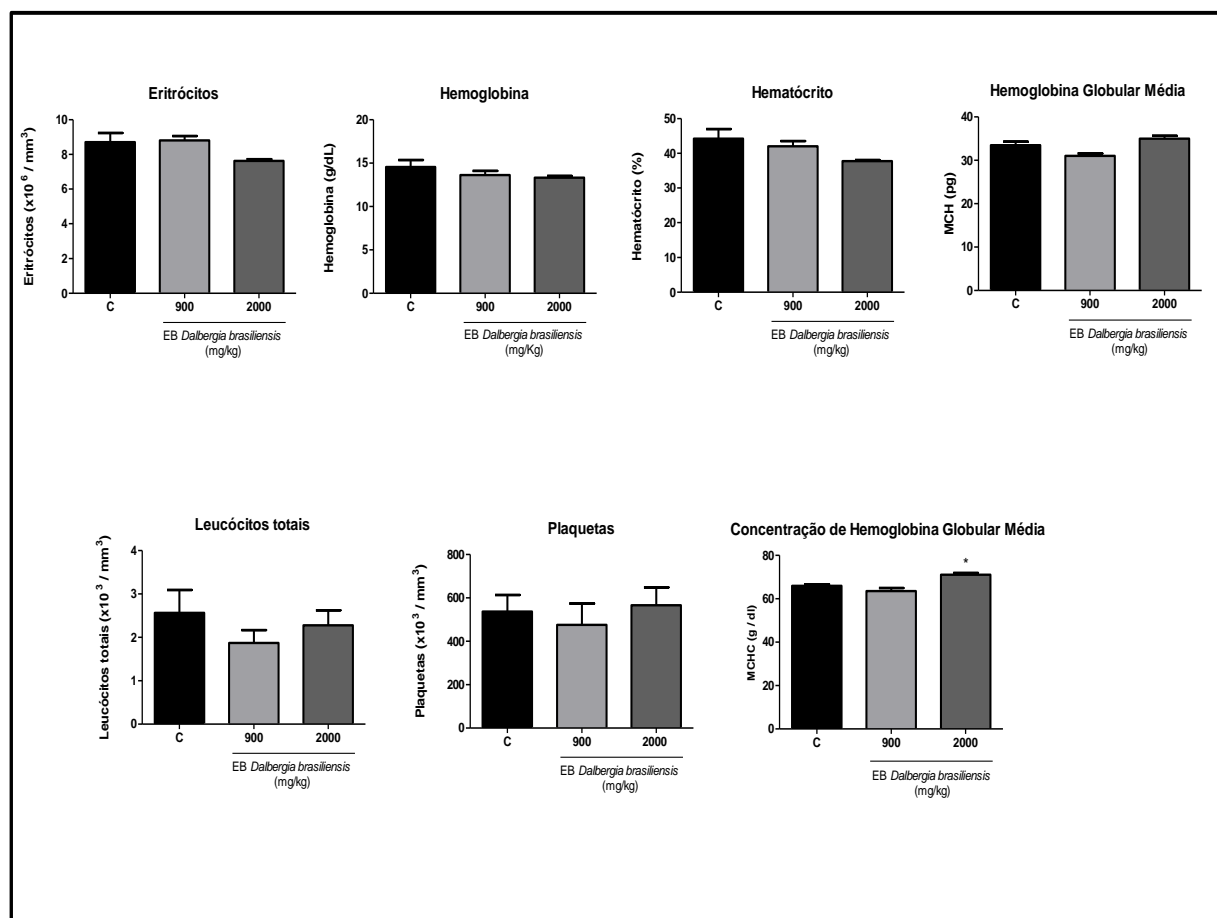
FONTE: O autor (2017)

NOTA: ALT: alanina aminotransferase, AST: aspartato aminotransferase. Efeitos do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg v.o.) administrada diariamente (21 dias) nas enzimas. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo que a coluna em preto indica os valores do grupo controle negativo. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.4 Avaliação de parâmetros hematológicos

Em relação à avaliação hematológica, não houve alteração significativa nos parâmetros; eritrócito, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, plaquetas e hemoglobina corpuscular média (HCM) entre os grupos experimentais. A concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) mostrou diferença estatística em relação ao grupo controle na dose de 2000 mg/kg (FIGURA 54).

FIGURA 54 - EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DIÁRIA DO EB DA *D. brasiliensis* NAS DOSAGENS DE PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS



FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeitos do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg v.o.) administrada diariamente (21 dias) nos parâmetros sanguíneos. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo que a coluna em preto indica os valores do grupo controle negativo. Os níveis de significância são indicados por * $p < 0,05$ quando comparados ao grupo controle. Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.5 Análises histopatológicas

As análises histológicas do fígado, estômago e rim dos camundongos não apresentaram alterações após toxicidade crônica, estando dentro dos limites da normalidade histológica para esses órgãos. No quadro 3, encontram-se os parâmetros avaliados no exame microscópico dos órgãos.

QUADRO 3 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS DOS CAMUNDONGOS NA TOXICIDADE CRÔNICA

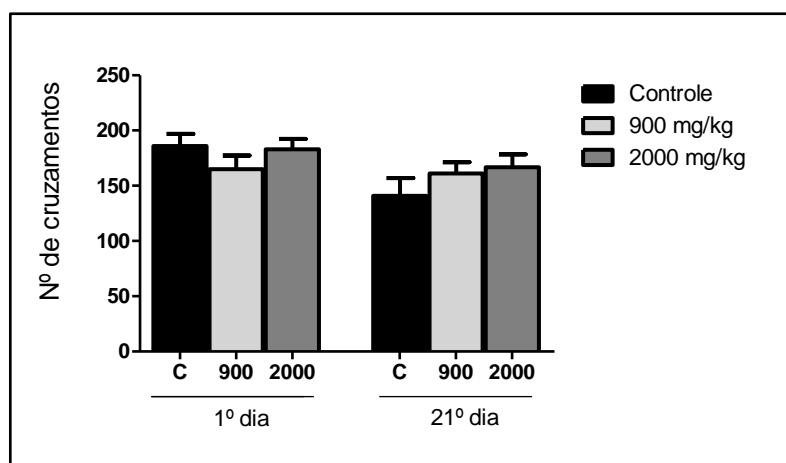
Órgão	Parâmetros avaliados	Grupo controle						900 mg/kg						2000 mg/kg					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
Fígado	Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Esteatose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Apoptose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Tumefação	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Colestase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Focos de linfócitos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estômago	Gastrite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Úlcera	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Erosão	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Hemorragia	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Rim	Hialinização Glomerular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Glomerulite	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Necrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Inflamação papila renal	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Inflamação cálice	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

FONTE: O autor (2017)

LEGENDA: - ausência

4.9.6 Teste do Campo Aberto

O ensaio do campo aberto foi realizado no primeiro dia do teste de toxicidade, com a administração do EB (900 e 2000 mg/kg) e no 21º dia (após 21 dias de administrações repetidas do EB nas mesmas doses). O extrato não demonstrou alterações significativas na atividade motora dos animais quando comparadas ao grupo controle. Como resultado do experimento, representado na FIGURA 55, o número de cruzamentos foi de 186 ± 22 para o grupo controle (1º dia) e 141 ± 33 (21º dia). O grupo com dose de 900 mg/kg teve 165 ± 25 (1º dia) e 168 ± 24 (21º dia) e o grupo com dose de 2000mg/kg teve 183 ± 19 (1º dia) e 168 ± 27 (21º dia).

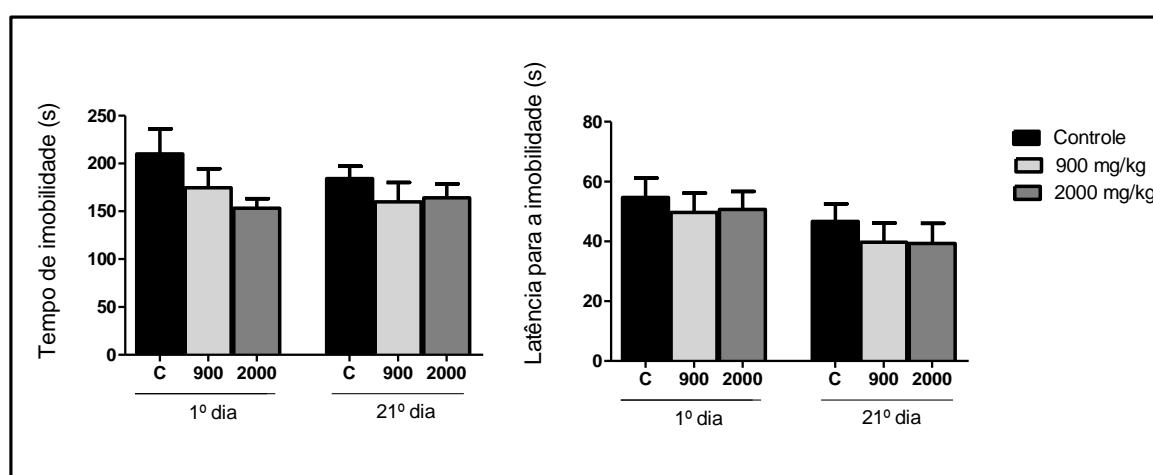
FIGURA 55 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* NO TESTE DO CAMPO ABERTO

FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg) nos camundongos submetidos ao teste do campo aberto no 1º e no 21º dia de experimento. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (soro fisiológico+Tween 80 0,1mL/kg). Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.7 Teste da Natação forçada

O teste da natação forçada foi realizado no 1º dia (administração aguda) e no 21º dia (administrações repetidas após 21 dias) do EB, doses de 900 e 2000 mg/mL. Conforme apresentado na FIGURA 56, verificou-se que o tempo de imobilidade e da latência para a imobilidade foram reduzidos de maneira não significativa.

FIGURA 56 - EFEITO DO EB DA *D. brasiliensis* NO TESTE DA NATAÇÃO FORÇADA

FONTE: O autor (2017)

NOTA: Efeito do EB das folhas (900 e 2000 mg/kg) nos camundongos submetidos ao teste da natação forçada no 1º e no 21º dia de experimento. Cada coluna representa a média \pm erro padrão da média de 6 animais, sendo a coluna C indicativa dos valores do grupo controle (soro fisiológico+Tween 80 0,1mL/kg). Utilizou-se ANOVA de uma via seguida de teste de tukey.

4.9.8 Discussão da avaliação de toxicidade crônica

Com relação aos efeitos tóxicos, foi observado que o EB das folhas administrado diariamente por 21 dias não alterou o peso dos animais (FIGURA 51), nem tampouco alterou o peso relativo de órgãos vitais como coração, baço, rins e pulmões (FIGURA 52) em relação ao grupo controle (grupo que recebeu apenas o veículo).

O exame bioquímico, realizado após os 21 dias de administração do extrato, teve a finalidade de avaliar as funções metabólicas desempenhadas pelos órgãos e tecidos, bem como evidenciar patologias ocultas. (FELDMAN et al., 2000). Eles avaliam as funções renal, hepática, pancreática e cardíaca, bem como evidenciam alterações no equilíbrio hídrico, eletrolítico e de minerais e também determinam alterações no metabolismo endócrino e da atividade muscular. (BERGONSO, 2007). Nos parâmetros bioquímicos avaliados a uréia obteve alterações nas duas doses testadas, o restante; ALT (alanina aminotransferase), AST (aspartato aminotransferase), creatinina e ácido úrico, não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos experimentais (FIGURA 53). No entanto, tem sido recomendado que a aplicabilidade das determinações da uréia no soro é significativamente potencializada quando os resultados da uréia são considerados juntamente com os resultados das determinações da creatinina, o qual não apresentou alteração entre os grupos.

A avaliação renal é determinada pela mensuração de uréia e creatinina. A uréia é um produto do catabolismo de aminoácidos e proteínas. Gerada no fígado, é a principal fonte de excreção do nitrogênio do organismo, principalmente pela urina, sendo, portanto, também utilizada para avaliar funções renais. (BURTIS et al., 2008). Em camundongos com sete semanas de idade, a média deste metabólito encontrada no soro é de 20,7 mg/dL. (RUSYN e THREADGILL, 2010). A creatinina é derivada do catabolismo da creatina, existente em grande quantidade nos músculos esquelético e cardíaco, fígado e rins, resultando na produção de fosfato inorgânico e creatinina, e esta é normalmente excretada pelos rins, principalmente por filtração glomerular. (GUYTON e HALL, 2006). Sua dosagem em plasma de camundongos com oito semanas de idade tem média de 0,28 mg/dL. (RIKEN BioResource Center, *The Jacksons Laboratory*, 2008). O aumento da taxa de creatinina no sangue ocorre

em todas as patologias renais em que há diminuição da filtração glomerular. Como a dosagem de creatinina deve ser realizada em paralelo com a de uréia para uma melhor avaliação da reversibilidade da lesão, e outros parâmetros avaliados no experimento não apresentaram diferenças estatísticas, acredita-se que o resultado alterado da ureia não comprometeu as funções renais dos animais tratados. A avaliação histológica e o peso relativo não alterado dos rins dos animais corroboram com essa afirmação.

A avaliação hepática mede as respostas às alterações anatômicas ou bioquímicas do fígado. (YEN et al, 2005). Dentre os testes utilizados para esta avaliação pode-se incluir as dosagens ALT e AST. A ALT é encontrada abundantemente no fígado, em quantidades moderadas no rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente plasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática. (SCHUMANN et al, 2002). A AST é encontrada em diversos órgãos e tecidos, incluindo coração, fígado, músculo esquelético e eritrócitos. Está presente no citoplasma e mitocôndrias, portanto sua elevação indica um comprometimento celular mais profundo. (SCHUMANN et al, 2002). Em pequenos animais, o aumento desta enzima é verificado em situações de desordens inflamatórias e degenerativas da musculatura esquelética, bem como em cardiomiopatias, por exemplo, isquemia, congestão, necrose, neoplasia, trauma. (COLE, 1986). Segundo Rusyn & Threadgill, *The Jacksons Laboratory*, (2010), a dosagem média dos parâmetros acima citados em soro de camundongos com sete semanas de idade é de 41 U/L e 152 U/L, respectivamente.

Em relação aos parâmetros hematológicos, a concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) mostrou diferença estatística em relação ao grupo controle na dose de 2000 mg/kg, os restantes; eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, leucócitos totais, plaquetas, hemoglobina corpuscular média (HCM); não apresentaram diferença estatística entre os grupos experimentais (FIGURA 54).

Os neutrófilos representam a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos, trauma nos tecidos ou algum sinal inflamatório. As plaquetas, além da função hemostática, também possuem importante papel na manutenção da integridade do endotélio, por meio da liberação de citocinas próangiogênicas e fatores de crescimento. (KAPLAN e JACKSON, 2011). A massa de glóbulos

vermelhos do sangue é mensurada por meio de três parâmetros: glóbulos vermelhos (eritrócitos e hemácias), hematócrito e hemoglobina. Os eritrócitos de camundongos são geralmente produzidos na medula óssea e no baço, diferentemente de outras espécies. (HEDRICH, 2004). Sua principal função é o transporte de oxigênio aos tecidos, através da hemoglobina. A hemoglobina é o principal componente dos eritrócitos. A concentração de hemoglobina é mensurada pelo volume total da mesma nos eritrócitos e todas as suas formas, funcionais ou não, são incluídas na determinação. O hematócrito é mensurado por meio do percentual relativo das hemáceas no sangue total. (BAIN, 2006). A relação entre os parâmetros da série vermelha pode ser obtida pela análise dos índices hematimétricos que irão fornecer informações adicionais sobre as hemáceas e hemoglobina. A hemoglobina corpuscular média (HCM) corresponde à média da quantidade de hemoglobina em cada eritrócito e a concentração da hemoglobina corpuscular média (CHCM) mensura a concentração de hemoglobina nos eritrócitos e geralmente está em torno de 30 e 38 g/dL nesta mesma espécie. (WEISS & WARDROP, 2010). A CHCM na dose do EB de 2000mg/kg se encontrou alterada, no entanto, toda a série vermelha dos parâmetros hematológicos avaliados não apresentaram diferença estatística.

Dando continuidade aos ensaios de toxicidade, foi realizada análises histopatológicas do fígado, rins e estômago dos camundongos após a administração do extrato nos 21 dias. O exame microscópico do fígado verificou ausência, em todas as amostras, de necrose, esteatose, apoptose, tumefação, colestase e focos de linfócitos; nos rins verificou a ausência de hialinização glomerular, glomerulite, necrose, inflamação da papila renal e inflamação do cálice; e no estômago verificou ausência de gastrite, úlcera, erosão, hemorragia e edema. Os órgãos analisados se encontraram nos limites da normalidade histológica, dado que corrobora com as avaliações bioquímicas e hematológicas referentes a ausência de efeitos tóxicos provocados pelo extrato da espécie.

O efeito de diferentes drogas tem sido investigado no teste do campo aberto, incluindo compostos com efetivo ou potencial efeito ansiolítico (benzodiazepínicos, ligantes de serotonina, neuropeptídios), compostos com atividade estimulante (anfetamina, cocaína), sedativa (neurolépticos) ou com atividade indutora de prostração. (PRUT e BELZUNG, 2003). Substâncias que causam a diminuição da locomoção podem apresentar efeito sedativo e relaxante muscular, os quais são

característicos dos depressores do SNC. (PARVATHI e RAVISHANKAR, 2013). No teste do campo aberto, o tratamento com o EB (900 e 2000 mg/kg) na administração aguda (1º dia) e após os 21 dias, não demonstrou alterações significativas na atividade locomotora dos animais quando comparadas ao grupo controle (FIGURA 55).

O teste de natação forçada tem sido o mais empregado para avaliar, pré clinicamente, o efeito antidepressivo, devido a sua fácil aplicação e a habilidade de detectar grande espectro de agentes antidepressivos. (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN et al., 2002). O teste é baseado na observação de que quando os roedores são colocados em uma situação de estresse inescapável (no caso, um cilindro de água sem possibilidade de fuga), eles apresentam inicialmente um comportamento de fuga, gradualmente substituído por imobilidade. A imobilidade é interpretada como o declínio da persistência de tentar escapar da situação estressante, através de um estabelecimento de um comportamento passivo do animal. (STÉRU et al., 1985; CRYAN et al., 2002). Drogas antidepressivas reduzem o tempo de imobilidade sem alterar a atividade locomotora basal. (BORSINI e MELI, 1988; CRYAN et al., 2002).

Extratos vegetais fornecem uma quantidade de constituintes que parecem agir inter funcionalmente em diferentes sistemas de órgãos do corpo, incluindo o cérebro. (CARLINI, 2003). Entre estes constituintes, os polifenóis e flavonoides especialmente, tem sido estudados pois atravessam a barreira hematoencefálica e alteram funções cerebrais. (MANDEL, 2008). Os flavonoides são considerados marcadores taxonômicos de muitas espécies de *Dalbergia*, no entanto, através do teste da natação forçada, verificou-se que o tempo de imobilidade e da latência para a imobilidade foram reduzidas de maneira não significativas após a administração (1º e 21º dia) do extrato da *D. brasiliensis* (FIGURA 56).

5 CONCLUSÃO

A espécie *Dalbergia brasiliensis*, conhecida popularmente como jacarandá, pertence a família Fabaceae e ocorre no cerrado e Floresta Atlântica do Brasil. Na revisão da literatura sobre o gênero *Dalbergia*, constatou-se que a química do gênero se caracteriza principalmente pela produção de isoflavonoides, neoflavonoides, glicosídeos, cinamilfenóis, quinonas e proantocianidinas. Muitas atividades biológicas e farmacológicas já foram investigadas e validadas no gênero.

Em relação ao estudo morfoanatômico da espécie, a anatomia de folhas e caule e a histoquímica, realizada por microscopia de luz, eletrônica e microtomografia, forneceu um conjunto de caracteres para esta espécie, que pode servir de parâmetro para ser usado como suporte adicional para sua taxonomia e controle de qualidade.

No estudo fitoquímico realizado, foi isolado e identificado a gliciteína (fração clorofórmio da folha), o hiperosídeo (fração acetato de etila da folha) e o aromadendrin-6-C-glucosídeo e o kaempferol-6-C-glucosídeo (fração acetato de etila da casca).

Na atividade alelopática, com as amostras da folha da espécie, as frações hexânica e clorofórmio inibiram a germinação de *L. sativa* e as frações clorofórmio e acetato de etila estimularam a germinação de *A. cepa*. Em relação a casca, nenhuma das amostras influenciou a germinação da *L. sativa*, no entanto, as frações hexano e clorofórmio inibiram germinação do *A. cepa*. No ensaio do crescimento, os extratos e frações da *D. brasiliensis* inibiram o crescimento da *L. sativa* e do *A. cepa*. Portanto, uma vez que demonstraram potencial fitotóxico para *L. sativa* e *A. cepa*, a espécie pode ser considerada uma fonte de estudos como herbicida misto, pois alterou a germinação e crescimento da espécie de duas classes taxonômicas.

A espécie não apresentou atividade antimicrobiana nas cepas testadas, esse resultado, complementou com testes de citotoxicidade já realizados (*Artemia salina* e atividade hemolítica) indicando um perfil atóxico dos extratos e frações. A mistura afrormosina e fujikinetina, isolados da fração clorofórmio da casca, não apresentou toxicidade frente às larvas do mosquito *Aedes aegypti*. No entanto, a *D. brasiliensis* inibiu a proliferação de células neoplásicas humanas. O composto isolado afrormosina e fujikinetina, obteve uma significativa atividade frente a todas as

linhagens neoplásicas utilizadas. A fração clorofórmio e acetato de etila das folhas e cascas também se destacaram. Estes resultados sugerem a aplicabilidade da espécie como um fármaco antitumoral, já que a busca por novos fármacos nesta área, que desenvolvam menos efeitos tóxicos, é constante.

Na avaliação da atividade gastroprotetora, verificou-se que a dose efetiva do extrato bruto da casca, 10 mg/kg, reduziu em 68% as úlceras induzidas por etanol e em 98% as úlceras induzidas pela indometacina. Deste modo, um dos possíveis mecanismos envolvidos na gastroproteção exercida pelo EB pode estar relacionado à síntese ou a disponibilidade de prostaglandinas na mucosa gástrica (já que os AINEs não seletivos inibem a COX-1). Os isoflavonoides, afrormosina e fujikinetina, isolados da fração clorofórmio da casca, reduziram significativamente as lesões por etanol (70%), como também reduziram a atividade da MPO e os níveis de LOOH, aumentou a produção de muco aderido a mucosa gástrica e não elevou os níveis de GSH. Em conjunto, os resultados confirmam a atividade gastroprotetora, uma vez que o mecanismo de ação combina um efeito protetor da mucosa gástrica, com um efeito antioxidante e inibição de migração de neutrófilos favorecendo uma cicatrização gástrica. Entretanto, outros mecanismos podem estar envolvidos mas que não fizeram parte do escopo deste estudo.

Pelos estudos da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, principalmente pelos resultados na 2ª fase da nocicepção induzida pela formalina e pela indução do edema de pata, que avaliam drogas na fase aguda da inflamação, constatou-se que o extrato bruto das folhas possui discreta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

O estudo da toxicidade crônica do extrato bruto das folhas da espécie mostrou que a administração diária, durante 21 dias, não acarretou alterações em indicadores toxicológicos como o peso dos animais, peso dos órgãos vitais dos animais (coração, pulmão, rins, baço, estômago), parâmetros bioquímicos, parâmetros hematológicos e atividades locomotoras. A análise histopatológica do fígado, rins e estômago, confirmou a ausência de efeitos tóxicos, pois estava dentro dos limites da normalidade histológica.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A busca por substâncias inéditas, não apenas para uso humano mas também veterinário e ambiental, incentiva a inovação, gerando produtos mais eficazes e com melhora do bem estar da população. Atualmente, a preocupação com as consequências ambientais da produção e utilização de medicamentos, herbicidas, larvicidas e demais produtos faz com que a pesquisa destas áreas volte-se para as fontes naturais. Os resultados demonstrados no presente estudo sugerem que a *Dalbergia brasiliensis* da família Fabaceae, pode ser utilizada futuramente no desenvolvimento de larvicidas e herbicidas ecológicos.

Os flavonoides, principal constituinte da espécie, são responsáveis por diversas atividades farmacológicas já reconhecidas cientificamente. Os resultados apresentados, juntamente com os realizados no mestrado, confirmam que a espécie tem potencial de se tornar um medicamento fitoterápico. A espécie demonstrou atividade anti-inflamatória e não apresentou toxicidade *in vivo*. A mistura afrormosina e fujikinetina, demonstrou haver uma expressiva atividade gastroprotetora, além de possuir atividade contra a proliferação de células neoplásicas humana. Diante desses resultados, é possível considerar a espécie *D. brasiliensis* de interesse para futuras investigações de suas atividades antitumoral e gastroprotetora, com potencial desenvolvimento de futuros medicamentos. O estudo morfoanatômico apresentado oferece referências para o controle de qualidade desta possível droga vegetal.

REFERÊNCIAS

- AMBROSIO, S.R.; TIRAPELLI, C.R.; COSTA, F.B.; OLIVEIRA, A.M. Kaurane and pimarane-type diterpenes from the *Viguiera* species inhibit vascular smooth muscle contractility. **Life Sciences**, v.79, p. 925–933, 2006.
- ANSARI, M.A.; RAZDAN, R.K.; TANDON, M.; VASUDEVAN, P. Larvicidal and repellent action of *Dalbergia sissoo* (F. Leguminosae) oil against mosquitoes **Bioresource Technology**, v.73, p.207-211, 2000.
- AN, R.B.; JEONG, G.S.; KIM, Y.C. Flavonoids from the heartwood of *Dalbergia odorifera* and their protective effect on glutamate-induced oxidative injury in HT22 cells. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.56, p. 1722-1724, 2008.
- AQUILA, M. E. A.; UNGARETTI, J. A. C.; MICHELIN, A. Preliminary observation on allelopathic activity in *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC. **Acta Horticulturae**, v. 502, p. 383-388, 1999.
- ASIF, M.; KUMAR, A. Anti-inflammatory activity of extract of *Dalbergia sissoo* (Roxb.) bark. **Malaysian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.7, n.1, p.39-50, 2009.
- AWAAD, A.S.; EL-MELIGY, R.M.; SOLIMAN, G.A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, v.17, p.101–124, 2013.
- AYRES, M. C. C. et al. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.90-97, 2008.
- BAZIRAMAKENGA, R.; LEROUX, G.D.; SIMARD R.R. Effects of benzoic and cinnamic acids on membrane permeability of soybean roots. *J. Chem. Ecol.*, p. 1271–1285, v. 21, 1995.
- BALA, V., KARIM, M.R., SHILL, A.K., SHAHID, I.Z. Antinociceptive, antioxidant and cytotoxic activity of *Dalbergia spinosa* spike. **Pharmacology on line**, v. 1, p. 560-566, 2011.
- BAIN, B.J. *Blood cells: a practical guide*. 4^a ed. Oxford, UK: Blackwell; 2006.
- BARNES, J. P.; PUTNAM, A.R.; ZBURKE, B.A.; AASSEN, A.J. Isolation and characterization of allelochemicals in rye herbage. **Phytochemistry**, v.26, n.5, p.1385-1390, 1987.
- BEUTLER, E.; LITCHMAN, M.A.; COLLIER, B.S.; KIPPS, T.J. Williams. *Hematology*. New York: McGraw Hill, 1995.
- BEÇAK, W.; PAULETE, J. **Técnicas de citologia e histologia**. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 1976. v. 1.
- BELZ, R.G.; PIEPHO, H.P. Modeling Effective Dosages in Hormetic Dose-Response Studies. **Plos One**, v. 16, 2012.
- BELDJOUDI, N.; MAMBU, L.; LABAIED, M.; GRELLIER, P.; RAMANITRAHASIMBOLA, D.; RASOANAIVO, P.; MARTIN, M.T.; FRAPPIER, F. Flavonoids from *Dalbergia louvelii* and their antiplasmodial activity. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1447-1450, 2003.

BERGONSO, THD. Valores bioquímicos referenciais de javali (*Sus scrofa scrofa*, Linnaeus, 1758), confinados em fazendas do estado de São Paulo [dissertação]. São Paulo: Universidade Estadual Paulista; 2007.

BERLYN, G P.; MIKSCHE, J.P. **Botanical microtechnique and cytochemistry** Eames: Iowa State University, 1976.

BERTE, P. E. ; LOPES, J. S. ; COMANDULLI, N. G. ; RANGEL, D. W. ; Monache, F.D. ; CECHINEL-FILHO, V. ; NIERO, R. ; ANDRADE, S. F. . Evaluation of the gastroprotective activity of the extracts, fractions, and pure compounds obtained from aerial parts of *Rubus imperialis* in different experimental models. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, p. 313-319, 2014.

BOU-ABBOUD, C. F.; WAYLAND, H.; PANLSEN, G. e GUTH, P. H. Microcirculatory stasis precedes tissue necrosis in ethanol-induced gastric mucosal injury in rat. **Digestive Diseases Sciences**, v. 33, n. 7, p. 872-877, 1988.

BOERS, N. NSAIDS and selective COX-2 inhibition: competition between gastroprotection cardioprotection. **The Lancet**, v.357, p.1222-1223, 2001.

BORSINI, F.; MELI, A. 1988. Is the forced swimming test a suitable model for revealing antidepressant activity? **Psychopharmacology**, v.94, p. 147–160.

BORRELLI, F.; IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytother Research**, v. 14, p. 581-591, 2000.

BRASIL. Ministério da Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para a Análise de Sementes**, SNDA/DNDU/CLU, 2º Ed. Brasília, 2009.

BRASIL. Resolução nº 35, de 27 de abril. MMA. Ministério do meio ambiente, 2011.

BRIJESH, S.; DASWANI, P. G.; ANTIA, N. H.; BIRDI, T. J. Studies on *Dalbergia sissoo* (Roxb.) leaves: Possible mechanism(s) of action in infections diarrhea. **Indian Journal Pharmacology**, v.38, n.2, p. 120-124, 2006.

BURGER, L.M. **Estudo anatômico do xilema secundário de sete espécies nativas do gênero *Dalbergia*, Leguminosae- Faboideae**. 1979. 191p. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraná.

BURTIS, C.A.; ASHWOOD, E.R.; BRUNS, D.E. (Eds). Tietz Fundamentos de Química . 6º Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

CAAMAL-MALDONADO, A. ; JIMÉNEZ-OSORNIO, J.J.; TORRES-BARRAGÁN, A.; ANAYA, A.L. The use of allelopathic legume cover and mulch species for weed control in cropping systems. **Agronomy Journal**, v.93, p. 27–36, 2001.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anty-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta medica**, v.70, p.93-103, 2004.

CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 501-512, 2003

CARVALHO, P.E.R.; VIANA NETO, J.A.A; DALMAS,I. **Comparação entre essências florestais nativas e exóticas em Quedas do Iguaçu, PR: Resultados Preliminares.** Curitiba: EMPRAPA-CNPF, 1987.

CARVALHO, P.E.R. Louro-pardo. Boletim de Pesquisa Florestal, Curitiba, n.17, p.63-66,1988.

CARVALHO, A. M. A synopsis of the genus *Dalbergia* (Fabaceae: Dalbergiae) in Brazil. **Brittonia**, v.49, n.1, p.87-109, 1997.

CARVALHO, P.E.R. **Jacarandá - *Dalbergia brasiliensis*.** Curitiba: EMPRAPA-CNPF, 2004.

CHANG, B.S.; KWON, Y.S.; KIM,C.M. The Chemical Structures and their Antioxidant Activity of the components isolated from the heartwood of *Hemiptelea davidii*. **Korean Journal of Pharmacology**, v.35, p. 80-87, 2004.

CHENG, Z.J.; KUO, S.C.; CHAN, S.; KOU, F.N.; TENG, C.M. Antioxidant properties of butein isolated from *Dalbergia odorifera*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1392, p.291-299, 1998.

CHIAPUSIO, G.; SANCHEZ, A.M.; REIGOSA, L.; GONZALEZ, L.; PELLISSIER, F. Dormancy breaking methods in *Ipomoea* and *Morremia* seeds. **Journal Chemical Ecology**, v.23, n.11, p.2445-2453, 1997.

CHING, Y.W.; BALUNAS, M. J.; CHAI, H. B.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from natural sources. **American Association of Pharmaceutical Scientist Journal**, v. 8, nº 2, p. 239-253, 2006.

CHOI, C.W., CHOI, Y.H., CHA, M.R., KIM, Y.S., YON, G.H., KIM, Y.K., CHOI, S.U., KIM, Y.H., RYU, S.Y. Antitumor components isolated from the heartwood extract of *Dalbergia odorifera*. **Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry**, v. 52, p. 375-379, 2009.

CNUBBEN, N. H. P., RIETJENS, I. M. C. M., WORTELBOER, H., van ZANDEN, J.& van BLADEREN, P. J. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.10, p.141-152, 2001.

CORREA, C.R; KYLE, D.J.; CHAKRAVERTY, S. CALIXTO, J.B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v.117, n.3, p.552-558, 1996.

CORREIA, A.F.; SEGOVIA, J.F.O.; GONCALVES, M.C.A.; DE OLIVEIRA, V.L.; SILVEIRA, D.; CARVALHO, J.C.T.; KANZAKI, L.I.B. Amazonian plant crude extract screening for activity against multidrug-resistant bacteria. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v.12, p.369-380, 2008.

COTA, R.H.S.; GRASSI-KASSISSE, D.M.; SPADARI-BRATFISH, R.C.; BRITO, A.R.M.S. Anti-ulcerogenic mechanisms of a lyophilized aqueous extract of *Dalbergia monetaria* L. in rats, mice and guinea-pigs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 51, p. 735-740, 1999.

CORNE, S.J., MORRISSEY, S.M., WOODS, R.J. Proceedings: A method for the quantitative estimation of gastric barrier mucus. **The Journal of Physiology**, v.242. 1974.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.p.599-601.

CRYAN, J.F.; MARKOU, A.; LUCKI, I. 2002. Assessing antidepressant activity in rodents: recent developments and future needs. **Trends in Pharmacological Sciences**, 23 (5):238-245.

CULLING, C.F.A.; ALLISON, R.T.; BARR, W.T. Cellular Pathology Technique. London: Butterworth and Co, 1985.

CUNHA, J. M.; MASUR, J. Evaluation of psychotropic drugs with a modified open field test. **Pharmacology**. v.16, p. 259-267,1978.

CUNHA, C.P. **Contribuição na investigação fitoquímica de *Glycine max* (soja) e *Dipteryx odorata* (cumaru) – otimização de análise cromatográfica e caracterização estrutural de flavonoides**. 147f. Dissertação de Mestrado em Ciências – Pós-graduação em Química - Área de Concentração em Química de Produtos Naturais. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.

DALARMI, L. **Estudo Fitoquímico e Avaliação das Atividades Biológicas da *Dalbergia brasiliensis*, Vogel**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal do Paraná. Curitiba, 2012.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; OCAMPOS, F.M.M.; OLIVEIRA, D.S.; BURCI, L.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Evolução na Pesquisa Fitoquímica aplicada às Atividades Biológicas do Gênero ameaçado de extinção *Dalbergia*. **Visão Acadêmica**, v.16, 2015a.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; OCAMPOS, F.M.M.; BURCI, L.M.; NASCIMENTO, K.F.; JESUS, C.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.M; ZANIN, S.M.W. Larvicidal activity of *Dalbergia brasiliensis* (Fabaceae – Papilionoideae) on *Aedes aegypti*. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.6, p. 881-885, 2015b.

DALARMI, L.; SILVA, C.B.; Szabo, E.M.; Oliveira, D.M.S.; Oliveira, M.; OLIVEIRA, V.B.; ZANIN, S.M.W.; DIAS, J.F.G.; MIGUEL, O.G., MIGUEL, M.D. *Dalbergia brasiliensis* Vogel Extracts in vitro Antioxidant Activity and Phytotoxic Effect in *Lactuca sativa* and *Allium cepa*. **International Journal of Sciences**, v.6, p.80-87, 2017.

DEESAMER, S.; KOKPOL, U.; CHAVASIRI, W.; DOUILLARD, S.; PEYROT, V.; VIDAL, N.; COMBES, S.; FINET, J.P. Synthesis and biological evaluation of isoflavone analogues from *Dalbergia oliveri*. **Tetrahedron**, v. 63, p.12986-12993, 2007.

DEMIR, S.; YILMAZ, M.; KÖSEOĞLU, M.; AKALIN, N.; ASLAN, D.; AYDIN, AS. Role of free radicals in peptic ulcer and gastritis. **Turk Journal of Gastroenterology**, v.14, n.1, p. 39-43, 2003.

DIAS, J. F. G, **Estudo Alelopático Aplicado de *Aster lenceolatus*, Willd.** 2005. 128f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Paraná.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J Pathol**, v.104, p. 15-29, 1971.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica. 2 ed. Sao Paulo:UNESP, 2002.

DIXIT, P.; CHILLARA, R.; KHEDGIKAR, V.; GAUTAM,J.; KUSHWAHA,P.; KUMAR,A.; SINGH, D.; TRIVEDI, R.; MAURYA, R. Constituents of *Dalbergia sissoo* Roxb. Leaves with osteogenic activity. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letter**, v. 15, p. 890-897, 2012.

DUKE, S.O.; DAYAN, F.E.; ROMAGNI, J.G.; RIMANDO, A.M. Natural products as sources of herbicide, current status and future trends. **Weed Research**, v.40, p. 99–111, 2000.

ESAU, K. Anatomía vegetal. Barcelona: Omega; 1972.

FAROOQUI, P.; VENKATASUBRAMANIAN, N.; NALLASAMY, V.K. Use of cuticular studies in distinguishing species of *Dalbergia*. **Plant Sci.** v.99, p. 7-14, 1989.

FAROOQ, M.; JABRAN, K.; CHEEMA, Z.A.; WAHID, A.; SIDDIQUE, K.H.M. The role of allelopathy in agricultural pest management. **Pest Manage. Sci.**, 67: 494–506, 2011.

FELDMAN BF, ZINKL JG, JAIN NC. Schalm's Veterinary Hematology. 5th ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.

FERNANDES, J.S.; APPOLONI, C.A.; FERNANDES, C.P. Determinação de parâmetros microestruturais e reconstrução de imagens 3-D de rocha de reservatório por microtomografia de raios X. **Revista Ciências Exatas e Naturais**, v.11, nº 01, 2009.

FERREIRA, P. M. P. **Determinação do potencial antitumoral de diterpenos isolados de *Casearia sylvestris* Swartz.** 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2006.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. Cambridge: Cambridge University Press, 1971.

FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v. 62(11), p.1433-1438, 2001.

FRESHNEY IR. Culture of animal cells. **A manual of Basic Technique**. 3^o ed. New York, Wiley-Liss, 1994.

GANGA, R.B.; MADHU, K.P.; VIJAYA, R.A. Investigation of antioxidant and anti-inflammatory activity of leaves of *Dalbergia paniculata* (Roxb). **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 455-458, 2012.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. Histochemie normale et pathologique. Paris: Gauthier – Villars, 1969. v. 1. 1904p.

GASSON, P.; MILLER, R.; STEKEL, D.J.; WHINDER, F.; ZIEMINSKA, K. Wood identification of *Dalbergia nigra* (CITES Appendix I) using quantitative wood anatomy, principal components analysis and naïve Bayes classification. **Annals of Botany**, v.105(1), p.45-56, 2010.

GUNDIDZA, M.; GAZA, N. Antimicrobial activity of *Dalbergia melanoxylon* extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v.40, p. 127-130, 1993.

GOBBO-NETO, L; LOPES, N. P. Plantas Medicinais: Fatores de Influência no Conteúdo de Metabólitos Secundários. **Química Nova**, v.30, n.2, p.374-381, 2007.

GODA, Y.; KIUCHI, F.; SHIBUYA, M.; SANKAWA, U. Inhibitors of prostaglandin biosynthesis from *Dalbergia odorifera*. **Chemical Pharmaceutical Bulletin**, v. 9, p. 2452-2457, 1992.

GUYTON SC, HALL JE. Tratado de Fisiologia Médica. 11a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006.

HAM, S.A.; KANG, E.S.; YOO, T.; LIM, H.H.; LEE, W.J.; HWANG, J.S.; PAEK, K.S.; SEO, H.G. *Dalbergia odorifera* Extract Ameliorates UVB-Induced Wrinkle Formation by Modulating Expression of Extracellular Matrix Proteins. **Drug Development Research**, v. 25, 2015.

HAJARE, S. W.; CHANDRA,S.; SHARMA,J; TANDAN,S.K.; LAL,J.; TELANG,A.G. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia sissoo* leaves. **Fitoterapia**. v.72, p.131-139, 2000.

HALLAK, A. M. G.; DAVIDE, L. C.; SOUZA, I. F. Effects of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) root exudates on the cell cycle of the bean plant (*Phaseolus vulgaris* L.) root. *Genet. Mol. Biol.*, p. 95–99, v.22, 1999.

HALABALAKI, M.; ALEXI, X.; ALIGIANNIS, N.; LAMBRINIDIS, G.; PRATSINIS, H.; FLORENTIN, I.; MITAKOU, S.; MIKROS, E.; SKALTSOUNIS, A.L.; ALEXIS, M.N. Estrogenic activity of isoflavonoids from *Onobrychis ebenoides*. **Planta Medica**, v.72, p.488-493, 2006.

HALTER, F.; TARNAWSKI, A. S.; SCHAMASSMAN, A. e PESKAR, B. M. Cyclooxygenase-2 implications on maintenance of gastric mucosal integrity and ulcer healing: controversies and perspectives. **Gut**. v. 49, n. 3, p. 443-453, 2001.

HAMAISHI, K.; KOJIMA, R.; ITO, M. Anti-ulcer effect of tea catechin in rats. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2206-2213, 2006.

HAMMER, K.A.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **Journal of Applied Microbiology**, v.86, n. 6, p. 985. 1999.

HARTBER, W. K.; Craig, G.B.J. Reproductive isolation in *Stegomyia* mosquitoes. II. Hybrid breakdown between *Aedes aegypti* and *A. mascarensis*. **Evolution**, v.24, p.692-703, 1970

HASSAN, F.I.; ZEZI, A.U.; YARO, A.H.; DANMALAM, U.H. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic of the methanol leaf extract of *Dalbergia saxatilis* Hook. In rats and mice. **J Ethnopharmacology**, v. 26, p. 74-78, 2015.

HEDRICH, H.J. (Ed). The Laboratory Mouse. London: Academic Press; 2004.

HENDRICH, A. B. Flavonoid-membrane interactions: possible consequences for biological effects of some polyphenolic compounds. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 27, n. 1, p. 27-40, 2006.

HELLOU, J.; ROSS, N. W.; MOON. T, W. Glutathione, glutathione S-transferase and glutathione conjugates, complementary markers of oxidative stress in aquatic biota. **Environmental Sciences Pollution Research**, v.19, n.6, p. 2007-2023, 2012.

HILLEGASS, L.M.; GRISWOLD, D.E.; BRICKSON, B.; ALBRIGHTSON-WINSLOW, C. Assessment of myeloperoxidase activity in whole rat kidney. **Journal Pharmacological Methods**, v.24, p. 285–295, 1990.

HIRUMA-LIMA, C. A.; GRACIOSA, J. S.; RODRIGUEZ, J. A.; HAUN, M.; NUNES, D.S.; BRITO, A. R. M. S. Gastroprotective effect of essencial oil from *Croton cajucara* Benth. (Euphobiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, n. 3, p. 229-234, 2000.

HIRUMA-LIMA, C.A; BATISTA, L.M.; ALMEIDA, A.B.A.; MAGRI, L.P.; SANTOS, L.C.; VILEGAS, W.; BRITO, A.R.M.S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, 2009.

HOLETZ, F.B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V.; FILHO, B.P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 1027-1031, 2002.

HOSTETTMANN, K.; WOLFENDER, J.L. The search for biologically active secondary metabolites. **Pest Management Science**, v.51, p. 471–482, 1997.

HOUGHTON, P.; FANG, R.; TECHATANAWAT, I.; STEVENTON, G.; HYLANDS, P.J.; LEE, C.C. The sulphorhodamine (SRB) assay and other approaches to testing plant extracts and derived compounds for activities related to reputed anticancer activity. **Methods**, v.42, p.377–387, 2007.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

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

IKEDA, Y.; UENO A.; NARABA, H.; OH-ISHI. Involvement of vaniloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v.69, p. 2911-2919, 2001.

INNOCENT, E., MAGADULA, J.J., KIHAMPA, C., HEYDENREICH, M. Bioactive isoflavones from *Dalbergia vacciniifolia* (Fabaceae). **Natural Product Communication**, V.5, P.903-906, 2010.

ITHARAT, A.; HOUGHTON, P.J.; ENO-AMOOQUAYE, E.; BURKE, P.J.; SAMPSON, J.H.; RAMAN, A. In vitro cytotoxic activity of thai medicinal plants used traditionally to treat cancer. **Journal Ethnopharmacology**, v. 90, p. 33-8, 2004.

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; MUKAINAKA, T., TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Isoflavonoids from *Dalbergia olivari*. **Phytochemistry**, v. 64, p.1265-1268, 2003a

ITO, C.; ITOIGAWA, M.; KANEMATSU, T.; RUANGRUNGSI, N.; HIGASHIHARA, H.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. New Cinnamylphenols from *Dalbergia* species with cancer chemopreventive activity. **Journal of Natural Products**. v.66, p.1574-1577, 2003b.

IVANCHECHEN,S.L. **Estudo morfológico e terminológico do tronco e casca de 30 espécies arbóreas em floresta ombrófila mista**. 1988. 221f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Paraná.

JAIGANESH, K.P.; AKILANDESHWARI, S.; SENTHAMARAI, R. Diuretic activity of root extracts of *Dalbergia spinosa* Roxb. **Anc Sci Life**, v. 28, p. 11-13, 2009.

JIANG, J.Q.; FANG, S.D.; XU, C.S.; LUO, J.T. Studies on the chemical constituents of *Rourea microphylla* (Hook. Et Arn) **Planch Acta Botanica Sinical**, v.32, n.5, p.376-379, 1990.

JIANG, Y.; WOOLLARD, A.C.S.; WOLFF, S.P. Lipid Hydroperoxide Measurement by Oxidation of Fe+2 in the Presence of Xilenol Orange. Comparison with the TBA Assay and an Iodometric Method. **Lipids**. v. 26, p. 853-856, 1991.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: MacGraw Hill Book, 1940.

JOLY, A.B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1998. p. 371-372 e 628-638.

JONES, M. K.; WANG, H.; PESKAR, B. M.; LEVIN, E.; ITANI, R. M.; SARFEH, I. J.; TARNAWSKI, A. S. Inhibition of angiogenesis by nonsteroidal anti-inflammatory drugs: Insight into mechanisms and implications for cancer growth and ulcer healing. **Nature Medicine**, v. 5, n. 12, p. 1418-1423, 1999.

JÚNIOR, R. L.; HÖEHR, N. F.; VELLASCO, A. P.; KUBOTA, L. T. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 112-119, 2001.

KALE, M.; MISAR, A.V.; DAVE, V.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A.M. Anti-inflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, p.300-304, 2007.

KALEGARI, M.; MIGUEL, M.D.; DIAS, J.F.G.; LORDELLO, A.L.L.; LIMA, C.P.; MIYAZAKI, C.M.S.; ZANIN, S.W.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, O.G. Phytochemical constituents and preliminary toxicity evaluation of leaves from *Rourea induta* Planch (Connaraceae). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 635-642.

KAPLAN, Z.S.; JACKSON, S.P. The Role of Platelets in Atherothrombosis. **Hematology Am Soc Hematol Educ Program**. 2011; 2011: 51-61. PubMed; PMID 15867408. Disponível em: <http://asheducationbook.hematologylibrary.org/content/2011/1/51.long>.

KASA, J.K.; SINGH, T.U.; PARIDA, S.; ADDISON, M.P.; DARZI, S.A., CHOUDHURY, S.; KANDASAMY, K.; SINGH, V., DASH, J.R., SHANKER, K.; MISHRA, S.K. Assessment os Indian Rosewood (*Dalbergia sissoo*) Standardized Leaf Extract on Isoproterenol-Induced Myocardial Injury in Rats. **Cardiovascular Toxicology**, v. 15, p. 250-260, 2015.

KATAVIC, P.L.; LAMB, K.; NAVARRO, H.; PRISINZANO, T.E. Flavonoids as opioid receptor ligands: identification and preliminary structure- activity relationships **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 1414-1416, 2007.

KAVIMANI, S.; VETRICHELVAN, T.; NAGARAJAN, N.S. Possible mechanism of anti-inflammatory activity of biochanin-A isolated from *Dalbergia sissooides*. **Indian Drugs** v.39, p.161-162, 2002.

KHAN, I.A.; AVERY M.A.; BURANDT,C.L.;GOINS,D.K.;MIKELL,J.R.; NASH T.E.; AZADEGAN,A.; WALKER, L.A. Anti-giardial Activity of Isoflavones from *Dalbergia frutescens* Bark **Journal Natural Products** , v.63, p.1414-1416, 2000.

KHAN, M.I.; KHAN, M.R. Gastroprotective Potential of *Dalbergia sissoo* Roxb. Stem Bark against Diclofenac-Induced Gastric Damage in Rats. **Osong Public Health Res Perspect.**, v. 5, p. 271-277, 2013.

KHAN F, YOUSAF Z, RANI S, KHAN F. Taxonomic treatment of medicinally important arboreal flora of tropical and subtropical region based on leaf epidermal anatomical markers. **J Med. Plants Res.** v.5, p.6439-6454, 2011.

KONOSHIMA, T.; KOKUMAI, M.; KOZUKA,M. Anti tumor promoting activities of afrormosin and soyasaponin I isolated from *Wistaria brachybotrys*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p.1776-1778, 1992.

KONTUREK, S.J.; KONTUREK, P.C.; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J Physiol Pharmacol.**, v. sep., p. 56, 2005.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DeBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 418-420, 1959.

KUMAR, P.; KUSHWAHA,P.; KHEDGIKAR, V.; GAUTAM, J.; CHOUDHARY, D.;SINGH, D.; TRIVEDI, R.; MAURYA, R. Neoflavonoids as potential osteogenic agents from *Dalbergia sissoo* heartwood. **Bioorg Med Chem Lett**, v. 24, p. 2664-2668, 2014.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v.135, p.41–60, 2008.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v.53, n.4, p.597-652, 2001.

LEE, S.; JUNG, S.H.; LEE, Y.S.; YAMADA, M.; KIM, B.K. Anti-inflammatory activity of hyperin from *Acanthopanax chiisanensis* roots. **Arch Pharm Res**, v.27, p.628–632, 2004.

LEONTIADIS, G.I., NYRÉN, O. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection, peptic ulcer disease and gastric cancer. In: Talley, N.J., Locke, G.R., Moayyedi, P., West, J., Ford, A.C., Saito, Y.A.(Eds.), *GI Epidemiology: Diseases and Clinical Methodology.* , 2nd ed. Wiley Blackwell, Oxford, p. 135–157, 2014.

LEVITT, J. Responses of plants to environmental stresses. New York: Academic Press; 1980.

LIMA; H.C. *Dalbergia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br> ,2015

LIO, R.X.; LI, L.; WANG, Q.; WANG, W.; BI, K.S.; GUO, D. Simultaneous Determination of nine flavonoids in *Dalbergia odorifera*. **Chromatographia**, v.61, n7/8, 2005.

LIU, Z.; TAO, X.; ZHANG, C.; LU, Y.; WEI, D. Protective effects of hyperoside (quercetin-3-O-galactoside) to PC12 cells against cytotoxicity induced by hydrogen peroxide and tert-butyl hydroperoxide. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.59, p. 481-490, 2005.

LOPES, A.A.; MAGALHÃES, T.R.; UCHÔA, D.A.; SILVEIRA E.R.; AZZOLINI, A.E.C.S.; KABEYA, L.M.; VALIM, Y.M.L.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.D.B.; LEAL, L.K.A.M. Afrormosin, an Isoflavonoid from *Amburana cearensis* A. C. Smith, Modulates the Inflammatory Response of Stimulated Human Neutrophils. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.113, p. 363–369, 2013.

LORENZI, H.; SOUZA, H.M. **Plantas ornamentais no Brasil : arbustivas, herbáceas e trepadeiras**. Nova Odessa: Plantarum, 1995. p. 269.

LUQMAN, S.; RIZVI, SI.; BEER, A.M.; KHARE, S.K.; ATUKEREN, P. Efficacy of herbal drugs in human diseases and disorders. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014: 273676, 2014.

MACÍAS, F. A.; CASTELLANO, D.; MOLINILLO, J. M. G. Search for a standart phytotoxic bioassay for allelochemicals. Selection of standard targetspecies. **Journal Agricultural and Food Chemistry**. v. 48, n. 6, p. 2512-2521, 2000.

MACÍAS, F.A.; MOLINILLO, J.M.G.; VARELA, R.M.; GALINDO, J.G.G. Allelopathy - a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v.63, p. 327–348, 2007.

MAGUIRE, J.D. Speed of germination aid selection and evaluation for seedling emergence and vigour. **Crop Science**, Madison, v.2, p.176-177, 1962.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. The effect of morphine on formalin-evoked behaviour and spinal release of excitatory amino acids and prostaglandin E2 using microdialysis in unconscious rats. **Br. J. Pharmacol.**, v.114, p.1069-1075, 1995.

MALHEIROS, A. ; PERES, M. T. L. P. Alelopatia: interações químicas entre espécies. In: YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. p. 503-523.

MANDEL, S.A.; AMIT, T.; WEINREB, O.; REZNICHENKO, L.; YODIM, M.B. Simultaneous amnipulation of multi- ple brain targets by green tea catechins: a potential neuroprotective strategy for Alzheimer and Parkinson diseases CNS. **Neurosci. Ther.**, v.14, p.352–365, 2008.

MASSIGNANI. J.J; LEMOS, M.; MAISTRO, E.L.; SCHAPHAUSER, H.P.; JORGE, R.F.; SOUSA, J.P.B.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, S.F. antiulcerogenic activity of the enssential oil of *Baccharis dracunculifolia* on different experimental models in rats. **Phytoter. Res.**, v. 23, 2009.

MASRESHA, B.; MAKONNEN, E.; DEBELLA, A. In vivo anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. **Journal of Ethofarmacology**, v. 142, p. 201 – 205, 2012.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. J.; SMITH, D. L. "Bendh-Top" bioassays for the discovery of bioactive natural products: an update. In: RAHMAN, A. R. (Ed.). *Studies in Natural Products Chemistry*. Amsterdam. **Elsevier Science Publis hers B.V.**, v.9 , n.1, p. 383-409, 1991.

METCALFE, C. R.; CHALK, L. **Anatomy of dicotyledons: leaves, stem, and woods in relation to taxonomy with notes on economic uses**. Oxford: Clarendon Press, 1950.v. 2.

MEYER, B. N. *et al.* Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta medica**, v.45, n. 5, p.31, 1982.

MIGUEL, O.G. Ensaio sistemático de análise em fitoquímica. Apostila da disciplina de fitoquímica do curso de farmácia da UFPR, Curitiba, 2003.

MISAR, A.V.; KALE, M.; JOSHI, M.; MUJUMDAR, A.M. Analgesic activity of *Dalbergia lanceolaria* bark extract in Swiss Albino mice. **Pharmaceutical Biology**, v.43, p. 723-725, 2005.

MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Effect of polyamines on acidified ethanol-induced gastric lesion in rats. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 33, n. 5, 1983.

MOJZIS, J.; HEGEDUSOVA, R.; MIROSSAY, L. Role of mucus in ischemia/reperfusion induced gastric mucosal injury in rats. **Physiological Research**, v. 49, n. 4, p. 441-446, 2000.

MONKS, A., SCUDIERO, D., SKEHAN, P., SHOEMAKER, R., PAULL, K., VISTICA, D., HOSE, C., LANGLEY, J., CRONISE, P., VAIGRO-WOLFF, A., GRAY-GOODRICH, M., CAMPBELL, H., MAYO, J., BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **J Natl Cancer Inst.**, v. 83, p. 757-766, 1991.

MONTRUCCHIO, D. P. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato e do alcaloide S-(+)-Dicentrina extraído de frutos de *Ocotea puberula* (Lauraceae)**. Santa Maria, 2012. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal de Santa Maria.

MORIMOTO, Y.; SHIMOHARA, K.; OSHIMA, S.; SUKAMOTO, T. Effects of the new anti-ulcer agent KB-5492 on experimental gastric mucosal lesions and gastric mucosal defensive factors, as compared to those of teprenone and cimetidine. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 57, n. 4, 1991.

MOREIRA, E. Marcha sistemática de análise em fitoquímica. *Tribuna farmacêutica*, v. 47, n. 1, p. 1-19, 1979.

MUJUMDAR, A.V.; MISAR, A.V.; UPADHYE, A.S. Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p.213-216, 2005.

NAM, S. Y.; KIM, N.; LEE, C. S.; CHOI, K. D.; LEE, H. S.; JUNG, H. C. et al. Gastric mucosal protection via enhancement of MUC5AC and MUC6 by geranyl gerylacetone. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 50, p. 11, p. 2110-2120, 2005.

NARAYANAN, M.C.; RAO, P.R.; SHANMUGAN, N.N.; GOPALAKRISHNAN, S.M.; DEVI, K. Isolation and characterization of bioactive isoflavonoids from the roots of *Dalbergia horrida*. **Natural Product Research**, v.21, n.10, p.903-909, 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS) **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. Approved Standard M27-A. Wayne, PA, USA: NCCLS. 1997.

NARWAL, S.S. Allelopathy in weed management. Pp 203–254 in Narwal SS (ed) *Allelopathy Update*. Volume 2. Basic and Applied Aspects. Science Publishers Inc, Enfield., 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G.M.; SNADER, K. M. Natural products as a source of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, v. 70, p. 461-477, 2007.

NICOLA, E.; GALLO, M.; IACARINO, M.; MERIC, S.; ORAL, R.; RUSSO, T.; SORRENTINO, T.; TÜNAY, O.; VUTTARIELO, E.; WARNAU, M.; PAGANO, G. Hormetic versus toxic effects of vegetable tannin in a multitest study. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**. v. 46, n. 3, p. 336-344, 2004.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; KOBAYASHI, T.; ISHIGURO, I. Involvement of the xanthine-xanthine oxidase system and neutrophils in the development of acute gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **Digest**. v. 58, n.4 p. 340-351, 1997.

NISHIDA, N.; TAMOTSU, S.; NAGATA, N.; SAITO, C.; SAKAI, A. Allelopathic effects of volatile monoterpenoids produced by *Salvia leucophylla*: inhibition of cell proliferation and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* seedlings. *J. Chem. Ecol.*, p. 1187–1203, v. 31, 2005.

OKWUTE, M.E.; ONYIA, R.; ANENE, C; AMODU, O.P. Protectant, insecticidal and antimicrobial potentials of *Dalbergia saxatilis* Hook f. (fabaceae). **African Journal of Biotechnology**, v.8, n.23, p.6556-6560, 2009.

OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; KAWAMATA, M.; NAMIKI, A. Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw. **Brain Res.**, v.787, p.161-164, 1998.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – OMS. Quality control methods for medicinal plants methods. 1998. p. 41 – 43.

PAIVA, S. R. de; LIMA, L. A.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Plumbagin quantification in roots of *Plumbago scandens* L. obtained by different extraction techniques. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.76, n.3, p.499-504, 2004.

PAPAZISIS, K.T., GROMICHALOS, G.D., DIMITRIADIS, K.A., KORTSARIS, A.H. Optimization of the sulforhodamine B colorimetric assay. **J Immunol Methods**, v.208, p.151-158, 1997.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v.28(11), p.2375-82, 2001.

PARK, J.D., LEE, Y.H., BAEK, M.I., KIM, S.I., AHN, B.Z. Isolation of antitumor agent from the heartwood of *Dalbergia odorifera*. **Saengyak Hakhoechi**, v. 26, p.323-326, 1995.

PARVATHI, M.; RAVISCHANKAR, K. Evaluation of antidepressant, motor coordination and locomotor activities of ethanolic root extract of *Clitoria ternatea*. *Journal of Natural Remedies*, v. 13, n. 1. 2013.

PEARSE, A. G. E. Histochemistry theoretical and applied: preparative and optical technology. 4.ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1980. 439 p.

PELT, J.M. A “revolução verde” da medicina. **O Correio da Unesco**, v.7, n.9, p.8-16, 1979.

PINÃ- RODRIGUES, F.C.M; LOPES, B.M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpiniaefolia* Benth. sobre sementes de *Tabebuia alba*. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

PORSOLT, R.D. Behavioural despair: present status and future perspectives. Antidepressants: thirty years on. London: CNS p. 85-94, 1990.

PORSOLT, R. D., LePICHON, M., JALFRE, M. Depression: a new animal model sensitive to antidepressant treatments. **Nature**, v. 266, n. 5604, p. 730- 732, 1977.

POTRICH, F.B.; ALLEMAND, A.; DA SILVA, L.M.; DOS SANTOS, A.C.; BAGGIO, C.H.; FREITAS, C.S.; MENDES, D.A.; ANDRE, E.; WERNER, M.F.; MARQUES, M.C. Antiulcerogenic activity of hydroalcoholic extract of *Achillea millefolium* L.: involvement of the antioxidant system. **J Ethnopharmacol.**, v. 130, n. 1, p. 85-92, 2010.

POZHARITSKAYA, O. N.; SHIKOV, A. N.; MAKAROVA, M. N.; KOSMAN, V. M.; FAUSTOVA, N. M.; TESAKOVA, S. V.; MARAKOV, V. G.; GALAMBOSI, B. Anti-inflammatory activity of a HPLC-fingerprint aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartite* L. *Phytomedicine*, v. 17, p. 463 – 468, 2010.

PROMDEM, W.; MONTHAKANTIRAT, O.; UMEHARA, K.; NOGUCHI, H.; DEEKNAMKUL, W. Structure and antioxidant activity relationships of isoflavonoids from *Dalbergia parviflora*. **Molecules**, v. 19, p. 2226-2237, 2014.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs of anxiety-like behaviors: a review. *European Journal of Pharmacology*, v. 463, p. 3-33, 2003

PUEBLA, P.; OSHIMA-FRANCO, Y.; FRANCO, L.M.; SANTOS, M.G.; SILVA, R.V.; RUBEM-MAURO, L.; FELICIANO, A.S. Chemical constituents of the bark of *Dipteryx alata* Vogel, an active species against *Bothrops jararacussu* venom. **Molecules**, v.12, p. 8193-8204, 2010.

PUTNAM, A.R. Allelochemicals from plants as herbicides. **Weed Technology**, v. 2, p.510–518, 1988.

QUINTAS A. T. Novo material de apoio para cortes histológicos. **Revista da Faculdade de Agronomia da UFRGS**, Porto Alegre, v 6, p 51-55, 1963

RAIHAN, S.Z.; MONIR, M.M.; BISWAS, P.; BISWAS, S.K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; AC, DAS. Antinociceptive activity of *Dalbergia spinosa* Roxb. stem bark. **Journal of Biological Sciences**, v.12, p.202- 205, 2012.

REIGOSA, M.J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, v.18, p.577-608. 1999.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zimozan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 387, n.1, p.111-118, 2000.

RIKEN BioResource Center / Experimental Animal Division. Blood chemistry, hematology, and body size for 33 RBRC wild-derived mouse strains. MPD:37811. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2008. Disponível em: <http://phenome.jax.org>.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.23, p.127-149, 1988.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**. São Paulo: Premier, p.159, 1997.

ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, v.77, p.433-443, 1979.

ROBBINS, S. L.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. Robbins patologia básica. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 910 p., 2013.

RODRIGUES, A. L. S.; SILVA, G. L.; METEUSI, A. S. FERNANDES, E. S.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Involvement of monoaminergic system in the antidepressant-like effect of the hydroalcoholic extract of *Siphocampylus verticillatus*. **Life Sciences**, v. 70, p. 1347-1358, 2002.

ROESER, K. R. Die Nadel der Schwarzkiefer-Massenprodukt und Kunstwerk der Natur. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 2, p. 33-36, 1962.

ROZEMA, J.; CHARDONNENS, A.; TOSSERAMS, M.; HAFKENSCHIED, R.; BRUIJNZEEL, S. Leaf thickness and UV-B absorbing pigments of plants in relation to an elevational gradient along the Blue Mountains, Jamaica. **Plant Ecology**, 1997.

ROY, N.; LASKAR, A.R.; SK, I.; KUMARI, D.; GHOSH, T.; BEGUM, N.A. A detailed study on the antioxidant activity of the stem bark of *Dalbergia sissoo* Roxb., an Indian medicinal plant. **Food Chemistry**, v.126, p.1115-1121, 2011.

RUSYN, I. Threadgill DW. Effects of trichloroethylene in males of 17 inbred mouse strains. MPD:Rusyn2. Mouse Phenome Database web site, The Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine USA. 2010. Disponível em: <http://phenome.jax.org>.

SAHA, S; SHILPI, J.A.; MONDAL, H.; HOSSAIN, F.; ANISUZZMAN, M.; HASSAN, M.M.; CORDELL, G.A. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological profile of the genus *Dalbergia* L. (Fabaceae). **Phytopharmacology**, v.4, p.291-346, 2013.

SAHA, S., ANISUZZAMAN, M., ISLAM, M.K., MONDAL, H., TALUKDER, C. (2013) Antibacterial and cytotoxic potential of *Dalbergia spinosa* Roxb. leaves. **Int J Pharm Sci Res**, v. 4, p. 512-515, 2013.

SALINAS, M.H.R. **Famílias de dicotiledôneas venezuelanas II. Subclases Rosidae y Asteridae: evolution, filogenia, gêneros**. Mérida: [s.n.], 1992.

SANCHEZ-MOREIRAS, A.M.; DE LA PENA, T.C.; REIGOSA, M.J. The natural compound benzoxazolin-2(3H)-one selectively retards cell cycle in lettuce root meristems. **Phytochemistry**, p. 2172–2179, v.69, 2008.

SANTOS A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachycinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v.31, n.4, p.381-389, 1997.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; De FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflam. Res.**, v.47, p. 302-307, 1998.

SANTOS A. R. S.; MIGUEL, O. G.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8,10-di-N-propillobelidiol hidrocloreto dihidrato isolated from

Siphocampylus vercillatus: Evidence for the mechanism of action. **Journal Pharmacol. Exp. Therap.**, v.289, n.1, p.417-426, 1999.

SARTORELLI, P.; CARVALHO, C.S.; REIMÃO, J.Q.; FERREIRA, M.J.P.; TEMPONE, A.G. Antiparasitic activity of biochanin A, an isolated isoflavone from fruits of *Cassia fistula* (Leguminosae). **Parasitology Research**, v.104, n.2, p. 311-314, 2008.

SEDLAK, J., LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulfhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v. 25, 1968.

SEMIDEY, N., 1999. Allelopathic crops for weed management in cropping systems. In: Allelopathy Update. Vol. 2, Basic and Applied Aspects, pp:271–281. S.S. Narwal (ed.). Science Publishers, Enfield, NH, USA

SHAMA, A.; BHOT, M.A.; CHANDRA, N. Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) *Kurz Anc Sci Life*, v.33, n.4, p.252-258, 2014.

SHRESTHA, S.P.; AMANO, Y.; NARUKAWA, T.; TAKEDA, T. Nitric oxide production inhibitory activity of flavonoids contained in trunk exudates of *Dalbergia sissoo*. **J Nat Prod.**, v. 71, p. 98-101, 2008.

SHIROTA, O.; PATHAK, V.; SEKITA, S.; SATAKE, M.; NAGASHIMA, Y.; HIRAYAMA, Y.; HAKAMATA, Y.; HAYASHI, T. Phenolic constituents from *Dalbergia cochinchinensis*. **J Nat Prod**, v. 66, p. 1128-1131, 2003.

SCHUMANN, G.; BONORA, R.; CERIOTTI, F.; FÉRARD, G.; FERRERO, C.A.; FRANCK, P.F., et al. IFCC primary reference procedures for the measurement of catalytic activity concentrations of enzymes at 37 degrees C. International Federation of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine. Part 5. Reference procedure for the measurement of catalytic concentration of aspartate aminotransferase. *Clin Chem Lab Med*. 2002 Jul; v.40(7), p.725-33. Erratum in: *Clin Chem Lab Med*. 2010 May; v.48(5), p. 615-621.

SINGH, R.H.; CHATURVEDI, G.N. Further studies on the antiarthritic effect of an indigenous drug *Dalbergia lanceolaria*. **Indian Journal of Medical Research**, v.54, 1966.

SINGH, H.P.; BATISH, D.R.; KOHLI, R.K. Allelopathic interactions and allelochemicals: new possibilities for sustainable weed management. **Crit. Rev. Plant Sci.**, p. 239–311, v.22, 2003.

SKEHAN, P., STORENG, R., SCUDIERO, D., MONKS, A., MCMAHON, J., VISTICA, D., WARREN, J. T., BOKESCH, H., KENNEY, S., AND BOYD, M. R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, p.1107–1112.

SKALISZ, L.L.; BEIJAMINI, V.; ANDREATINI, R. 2004. Effect of *Hypericum perforatum* on marble-burying by mice. **Phytotherapy Research**, 18, 399–402.

SONG, T.T.; HENDRICH, S.; MURPHY, P.A. Estrogenic activity of glycitein, a soy isoflavone. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 1607-1610, 1999.

SONGSIANG, U.; WANICH, S.; PITCHUANCHOM, S.; NETSOPA, S.; UANPORN, K.; YENJAI, C. Bioactive constituents from the stems of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v.80, p.427-431, 2009.

SONGSIANG, U., HAHNVAJANAWONG, C., YENJAI, C. Cytotoxicity of chemical constituents from the stem of *Dalbergia parviflora*. **Fitoterapia**, v. 82, p. 1169-1174, 2011.

SOUZA, A.R.M.; COTA, R.H.S.; NUNES, D.S.. Gastric antiulcerogenic effects of *Dalbergia monetaria* L in Rats. **Phytotherapy Research**, v.11, p.31431, 1997.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às Ciências Biológicas**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Microscopia Eletrônica, 1998.

SOUZA, A.P.S.; GUILHON, G.M.S.P.; SANTOS, L.S. Metodologias Empregadas em Estudos de Avaliação da Atividade Alelopática em Condições de Laboratório – Revisão Crítica. **Planta Daninha**, v.28, n.3, p.689-697, 2010.

SOUSA, S.F.G. **Avaliação da cultura do milho e da decomposição da palhada submetida à hormesis**. 2013. 65 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia/Energia na Agricultura)-Faculdade de Ciências Agrônômicas, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2013.

STEARNS, W.T. **Botanical Iati**, New York : Hafner, p.566, 1983.

STERU, L.; CHERMAT, R.; THIERRY, B.; SIMON, P. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology** (Berl) v.85, p.367–370, 1985.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J.M. *Methods in Plant Biochemistry Assays for Bioactivity*; In: Hostettmann K. (ed.) London: Academic Press, 71-133, 1990.

SUGIYAMA, A.; ZHU, B.M., TAKAHARA, A.; SATOH, Y., HASHIMOTO, K. Cardiac effects of *Salvia miltiorrhiza*/ *Dalbergia odorifera* mixture, an intravenously applicable Chinese medicine widely used for patients with ischemic heart disease in China. **Circulation Journal**, v. 66, p. 182-184, 2002.

TANAKA, J.C.A.S.; SILVA, C.C.; DIAS, F.B.D.; NAKAMURA, C.U.; CARVALHO, J.E.; JOGLIO, M.A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TAO, Y.; WANG, Y. Bioactive sesquiterpenes isolated from the essential oil of *Dalbergia odorifera*. T. Chen. **Fitoterapia**, v. 81, p. 393-396, 2010.

TJØLSEN A, BERGE OG, HUNSKAAR S, ROLAND JH, HOLE K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p. 5-17, 1992.

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: **The pharmacology of pain.**, BESSON, M. J.; DICKENSON, A. Berlin: Springer-Verlag, p. 21-41, 1997.

UCHENDU, C.N.; LEEK, B.F. Adrenergic influence of uterine muscle contractions stimulated by a glycoside from the root of *Dalbergia saxatilis*. **Indian Journal Exp Biol**, v. 37, p. 350-354, 1999.

UCHENDU, C.N.; KAMALU, T.N.; ASUZU, I.U. A preliminary evaluation of antifertility activity of a triterpenoid glycoside (DSS) from *Dalbergia saxatilis* in female Wistar rats. **Pharmacol Research**, v. 41, p. 521-525, 2000.

UMEHARA, K.; NEMOTO, K.; MATSUSHITA, A.; TERADA, E.; MONTHAKANTIRAT, O.; DE- EKNAMKUL, W.; MIYASE, T.; WARASHINA, T.; DEGAWA, M.; NOGUCHI, H. Flavonoids from the heartwood of the Thai medicinal plant *Dalbergia parviflora* and their effects on estrogenic-responsive human breast cancer cells. **Journal Natural Products**, v.72, p. 2163-2168, 2009.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in spinal cord. **Progress in Neurobiology**, v.64, p.327-363, 2001.

VASUDEVA, N.; VATS, M.; SHARMA,SK ; SARDANA, S. Chemistry and biological activities of the genus *Dalbergia*. **Pharmacognosy Review**, v.3, n.6, p.307-319, 2009.

VASUDEVA, N.; VATS, M. Anti-spermatogenic activity of ethanol extract of *Dalbergia sissoo* Roxb. Stem bark. **Journal of Acupuncture Meridian Studies**, v. 2, p. 116-122, 2011.

VERMA, H.P.; SINGH, S.K. Effect of aqueous leaf extract of *Dalbergia sissoo* Roxb. On spermatogenesis and fertility in male mice. **Eur J Contracept Reprod Health Care**, v. 19, p. 475-486, 2014.

VITALE, D.C.; PIAZZA, C.; MELILLI, B.; DRAGO F.; SALOMONE S. Isoflavones: estrogenic activity, biological effect and bioavailability. **European Journal of Drugs Metabolism and Pharmacokinetics**, v. 38, p. 15-25, 2013.

WAGNER, R.; KOGAN, M.; PARADA, A.M. Phytotoxic activity of root absorbed glyphosate on corn seedlings (*Zea mays* L.). **Weed Biology and Management**, v.3, p.223- 232, 2003.

WALLACE, J. L. Building a better aspirin: gaseous solutions to a century-old problem. **British Journal of Pharmacology**, v. 152, n. 4, p. 421-428, 2007.

WANG, W.Q.; MA, C.G.; XU, S.Y. Protective effect of hyperin against myocardial ischemia and reperfusion injury. **Zhongguo Yao Li Xue Bao**, v.17, p. 341–344, 1996.

WANG, S.; ZHENG, Z.; WENG, Y.; YU,Y; ZHANG, D.; FAN, W.; DAI, R.; HU, Z. Angiogenesis and anti-angiogenesis activity of Chinese medicinal herbal extracts. **Life Sci.**, v.74, p. 2467-2478, 2004.

WANG, H., MEI, W.L., ZENG, Y.B., DAI, H.F. Phenolic compounds from *Dalbergia odorifera*. **Phytochemistry Letters**, v.16, 2014.

WEISS, D.J.; WARDROP, K.J. (Eds). Schalm's Veterinary Hematology. 6th ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.

WESTON, L.A., Utilization of allelopathy for weed management in agroecosystems. **Agron. J.**, v.88, p. 860–866, 1996.

YAMADA, K.; ANAI, T.; HASEGAWA, K. Lepidimolide, an allelopathic substance in the exudates from germinated seeds. **Phytochemistry**, v. 39, n. 5, p.1031-1032, 1995.

YEN, M.H.; WENG, T.C.; LIU, S.Y.; CHAI, C.Y.; LIN, C.C. The hepatoprotective effect of *Bupleurum kaioi*, an endemic plant to Taiwan, against dimethylnitrosamine-induced hepatic fibrosis in rats. **Biol Pharm Bull.** v.28, p. 442-448, 2005.

ZHANG, Y.; WANG, D.; YANG, L.; ZHOU, D.; ZHANG, J. Purification and Characterization of Flavonoids from the Leaves of *Zanthoxylum bungeanum* and Correlation between their Structure and Antioxidant Activity. **Plos one**, v.9, 2014.

ZHANG, N.; YING, M-D.; WU, Y-P.; ZHOU, Z-H.; YE, Z-M.; LI, H. Hyperoside, a Flavonoid Compound, Inhibits Proliferation and Stimulates Osteogenic Differentiation of Human Osteosarcoma Cells. **Plos one**, v.9, 2014.

ZIMMERMAN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v. 16, p. 109–110, 1983.

ZOU, Y.; LU, Y.; WEI, D. Antioxidant activity of a flavonoid-rich extract of *Hypericum perforatum* L. in vitro. **J Agric Food Chem**, v.52, p.5032–5039, 2004.

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÃO IBAMA



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 Nº35, 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 Akel 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*”.

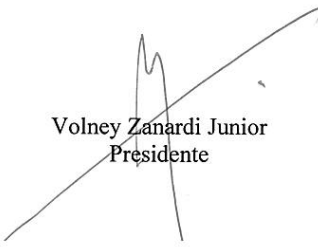
Objetivo da Autorização: Avaliar sob aspecto morfoanatômico, químico e biológico das espécies acessadas constantes do projeto de pesquisa.

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 – CERTIFICADO CEUA



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



Nº 794

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, instituído pela PORTARIA Nº 787/03-BL, de 11 de junho de 2003, com base nas normas para a constituição e funcionamento da CEUA, estabelecidas pela RESOLUÇÃO Nº 01/03-BL, de 09 de maio de 2003 e considerando o contido no Regimento Interno da CEUA, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado, estão de acordo com os princípios éticos estabelecidos pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e exigências estabelecidas em "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

CERTIFICATION

The Ethics Animal Experiment Committee of the Setor de Ciências Biológicas of the Federal University of Paraná, established by the DECREE Nº 787/03-BL on June 11th 2003, based upon the RESOLUTION Nº 01/03-BL from May 9th 2003, and upon the CEUA internal regiment, CERTIFIES that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the ethical principals established by the Experimental Animal Brazilian Council (COBEA), and with the requirements of the "Guide for the Care and Use of Experimental Animals (Canadian Council on Animal Care)".

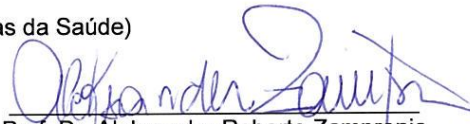
PROCESSO: 23075.011375/2014-31

APROVADO: 22/05/2014 – R.O. 04/2014

TÍTULO: Investigação farmacológica de extratos vegetais utilizados popularmente – ênfase em atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

AUTORES: Deise Prehs Montrucchio, Fernanda Maria Martins Ocampos, Daniella Maria Soares de Oliveira, Ana Flávia Schwabe Duarte, Mariana Saragioto Krause, Vinicius Bednarczuck de Oliveira, Luciane Dalarmi

DEPARTAMENTO: Farmácia (Setor de Ciências da Saúde)


Prof. Dr. Aleksander Roberto Zamprônio
Coordenador da CEUA