

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Jéssica Leiras Mota Conegundes

Caracterização química, estudo farmacológico e toxicológico de *Siparuna guianensis* Aublet. (Siparunaceae)

Juiz de Fora
2017

Jéssica Leiras Mota Conegundes

Caracterização química, estudo farmacológico e toxicológico de *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae)

Dissertação de Mestrado do curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Profa. Dra. Elita Scio Fontes
Co-orientadora: Profa. Dra. Josiane Mello da Silva

Juiz de Fora

2017

Ficha catalográfica elaborada através do programa de geração automática da Biblioteca Universitária da UFJF, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Conegundes, Jéssica Leiras Mota .

Caracterização química, estudo farmacológico e toxicológico de *Siparuna guianensis* Aublet. (Siparunaceae) / Jéssica Leiras Mota Conegundes. -- 2017.

95 f. : il.

Orientadora: Elita Scio

Coorientadora: Josiane Mello da Silva

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Farmácia e Bioquímica. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2017.

1. Antioxidante. 2. CLAE. 3. *Siparuna guianensis*. 4. Produtos naturais . 5. Toxidez aguda. I. Scio, Elita, orient. II. Silva, Josiane Mello da, coorient. III. Título.

Caracterização química, estudo farmacológico e toxicológico de *Siparuna guianensis* Aublet. (Siparunaceae)

Jéssica Leiras Mota Conegundes

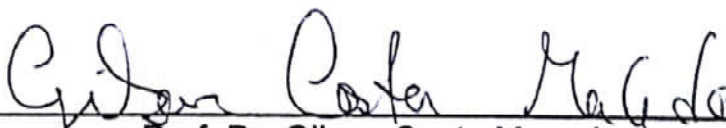
ELITA SCIO FONTES

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 28/06/2017



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Júnior



Prof. Dr. Gilson Costa Macedo



Profa. Dra. Elita Scio Fontes

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo à Deus, que se faz presente em todos momentos de minha vida concedendo-me força e paciência para seguir em frente;

À minha mãe, que juntamente com meu irmão, são fontes de inspiração e me ensinam a cada dia o significado do amor incondicional;

Aos meus avós, segundos pais, pelas orações e pelos humildes ensinamentos que fazem de mim quem sou;

À minha família pelo incentivo e torcida;

A todos meus amigos, em especial minha companheira de vida e trabalho Maria Fernanda, pela paciência, disponibilidade e empatia. Amo vocês;

À minha orientadora Dra. Elita Scio Fontes, pelos anos de convívio acrescidos de conhecimentos intelectuais e pessoais. Obrigada por me acolher em seu, 'nosso', grupo de pesquisa. Você é um exemplo!

À minha co-orientadora Josiane, pela amizade e por me permitir fazer parte de um trabalho tão grandioso que me proporcionou um crescimento científico incalculável;

A todos colegas do LPNB, pelo companheirismo, apoio e amizade. Com vocês os dias de trabalho se tornaram mais leves e prazerosos;

Aos técnicos e docentes do departamento de bioquímica da UFJF, pelo apoio prestado e ensinamentos compartilhados;

Aos professores Dr. Gilson Macedo e Dr. João Xavier por aceitar o convite e participar da banca examinadora deste trabalho;

Novamente ao professor Dr. Gilson Macedo do departamento de Imunologia e Doenças Infecto-Parasitárias da UFJF, pela realização da atividade anti-inflamatória *in vitro*;

Por fim, agradeço a todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para minha formação, tanto pessoal quanto profissional.

A todos vocês, muito obrigada!

RESUMO

A espécie *Siparuna guianensis Aublet*. (Siparunaceae), conhecida como negramina, capitu, folha santa e limão-bravo, é amplamente distribuída no território nacional. A espécie tem sido tradicionalmente utilizada no combate de sintomas de algumas patologias como febre, inflamação, dores de cabeça e no corpo. O presente estudo teve como objetivos avaliar a atividade antioxidante, antinociceptiva, anti-inflamatória e toxidez oral aguda da partição em diclorometano (PDCM) das folhas de *S. guianensis*, bem como determinar o perfil químico de PDCM e suas frações. Para tal, as folhas secas foram submetidas à extração em metanol por maceração estática. O extrato metanólico foi então particionado, primeiramente com hexano, seguido de diclorometano, obtendo-se a PDCM que, por sua vez, foi fracionada e forneceu 14 frações (FD1 a FD14). O perfil químico da PDCM e suas frações foi determinado por cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), possibilitando a identificação de constituintes terpênicos e flavonoides. Com relação à atividade antioxidante *in vitro*, a PDCM foi eficaz em reduzir o radical DPPH (CI₅₀ 25 µg/mL); no método do fosfomolibidênio foi encontrado o valor de 0,34 mg/mg de PDCM em equivalentes de ácido ascórbico; no método do TBA a amostra na concentração de 7,5 mg foi capaz de inibir a peroxidação lipídica de forma estatisticamente igual à substância de referência (BHT), na mesma concentração. *In vivo*, a atividade anti-inflamatória foi avaliada em camundongos pelo método do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e pelo modelo de peritonite induzida por LPS. No primeiro modelo PDCM administrada por via oral (v.o.) foi capaz de reduzir significativamente o edema nas doses de 100 e 300 mg/kg em 54 e 52%, respectivamente. Enquanto que no segundo ensaio, PDCM na dose de 100 mg/kg foi capaz de inibir a migração leucocitária em 53%. O estudo toxicológico agudo, durante 14 dias, mostrou que esta amostra é segura para administração por via oral. PDCM v.o. apresentou ação antinociceptiva em dois dos três modelos utilizados. No modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético, as doses de 100, 200 e 300 mg/kg foram capazes de inibir o número de contorções em 67, 71 e 83%, respectivamente. No teste da formalina, foi observada atividade tanto na nocicepção neurogênica, quanto na nocicepção inflamatória. Na primeira, todas as doses (100, 200 e 300 mg/kg) foram eficazes reduzindo em 56, 54 e 48%, respectivamente, o tempo de lambida. Do mesmo modo, na segunda fase todas as doses foram eficazes, porém de forma menos significativa que na primeira fase, reduzindo o tempo de lambida em 29, 38 e 44%, respectivamente. Devido à natureza comportamental dos ensaios antinociceptivos, o teste do campo aberto mostrou que a amostra não tem atividade sobre a locomoção dos animais. Os resultados indicam que a PDCM de *S. guianensis* possui potencial antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória, provavelmente relacionados aos constituintes terpênicos e flavonoides presentes na espécie.

Palavras-chaves: antioxidante, CLAE, *Siparuna guianensis*, produtos naturais, toxidez aguda.

ABSTRACT

The species *Siparuna guianensis* Aublet. (Siparunaceae), known as negramina, capitú, folha-santa e limão-bravo, is widely distributed around the national territory. Species have traditionally been used to combat the symptoms of some pathologies fever, inflammation, headaches and body aches, and other disorders. The present study aimed to evaluate the antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities and acute oral toxicity profile of the dichloromethane partition (PDCM), as well as to determine the chemical profile of PDCM and its fractions. For this, the dry leaves were subjected to methanol extraction by static maceration. The methanolic extract was subject to liquid-liquid partition, firstly with hexane, followed by dichloromethane, to obtain the dichloromethane partition (PDCM). Then, PDCM was fractionated, and 14 fractions (FD1 – FD14) were collected. The PDCM and fractions chemical profiles was performed using thin layer chromatography (TLC) and high performance liquid chromatography (HPLC), which allowed the identification of terpenes and flavonoids. According to the *in vitro* tests, PDCM was effective in reducing the DPPH radical (IC_{50} 25 μ g/mL); the value of 0.34 mg/mg of PDCM in ascorbic acid equivalents was determined using the fofomolybdenium assay; the sample at 7.5 mg was able to inhibit lipid peroxidation with no statistical difference compared to the reference substance (BHT) at the same concentration in the TBA assay. Besides, the *in vivo* anti-inflammatory activity was investigated in mice by the cróton oil-induced ear edema and by the model of peritonitis induced by LPS. PDCM was capable to reduce the ear edema at 100 and 300 mg/kg by 54% and 52%, respectively. Also, PDCM inhibited the leucocyte migration by 53% at 100 mg/kg. The acute toxicological evaluation, during 14 days, suggested that the oral administration of this sample is safe. PDCM also showed antinociceptive action in two of the three models used. The number of writhing was reduced by 67%, 71% and 83% at 100, 200 and 300 mg/kg, respectively, in acetic acid-induced writhing test. The neurogenic and inflammatory antinociceptive activity was also observed by the formalin test. All doses (100, 200 and 300 mg/kg) were effective, reducing by 56%, 54% e 48% the licking time during the neurogenic inflammation, respectively. All doses (100, 200 and 300 mg/kg) were also effective in the second phase, however in a less significant manner, reducing the licking time by 29%, 38%, and 44%, respectively. Due to the behavioral nature of the antinociceptive assays, the open field test was carried out to ensure that the sample has no interference on animal locomotion. The results indicated that PDCM from *S. guianensis* is endowed with antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory potential, probably related to the terpenes and flavonoids presented in this species.

Keywords: acute toxicity, antioxidant, HPLC, *Siparuna guianensis*, natural products.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1:	Folhas (A) e frutos (B) da espécie <i>Siparuna guianensis</i>	18
Figura 2:	Esquema inicial da resposta inflamatória.....	27
Figura 3:	Fluxograma com processo extrativo para obtenção da PDCM, seu fracionamento e isolamento dos constituintes FD3 ₁ e FD5 ₁	35
Figura 4:	Orelha direita após aplicação do agente flogístico.....	43
Figura 5:	Manifestação comportamental característica da administração de ácido acético i.p.....	44
Figura 6:	Lambadura da pata direita devido a administração s.pl. de formalina..	45
Figura 7:	Imersão da cauda em banho-maria para execução do teste.....	46
Figura 8:	Imagem demonstrativa do aparato utilizado no experimento <i>open-field</i>	47
Figura 9:	Perfil cromatográfico da PDCM das folhas de <i>S. guianensis</i> por CLAE.....	50
Figura 10:	Perfil cromatográfico da amostra FD31, proveniente da FD3.....	50
Figura 11:	Perfil cromatográfico da amostra FD5, proveniente da PDCM.....	51
Figura 12:	Perfil cromatográfico da amostra FD11, proveniente da PDCM.....	51
Figura 13:	Perfil cromatográfico da amostra FD13, proveniente da PDCM.....	52
Figura 14:	Perfil cromatográfico da amostra FD14, proveniente da PDCM.....	53
Figura 15:	Efeito antioxidante da PDCM em modelo de peroxidação lipídica...	56
Figura 16:	Efeito da PDCM de <i>S. guianensis</i> sobre a massa relativa dos órgãos dos camundongos ao fim dos 14 dias de experimento.....	58
Figura 17:	Efeito da PDCM de <i>S. guianensis</i> sobre o consumo de água dos camundongos durante 14 dias.....	58
Figura 18:	Efeito da PDCM de <i>S. guianensis</i> sobre o consumo de ração dos camundongos durante 14 dias.....	59
Figura 19:	Efeito da PDCM de <i>S. guianensis</i> sobre o ganho de peso corporal dos camundongos durante 14 dias.....	59

Figura 20: Efeito da PDCM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos.....	60
Figura 21: Efeito da PDCM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pela aplicação i.p. de LPS.....	61
Figura 22: Efeito de <i>S. guianensis</i> via oral, sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	62
Figura 23: Efeito de <i>S. guianensis</i> , indometacina via oral e morfina via intraperitoneal, sobre o tempo de lambadura de pata (S) na 1ª fase (A) e 2ª fase (B) do teste da formalina sobre camundongos.....	63
Figura 24: Efeito de <i>S. guianensis</i> via oral e morfina via intraperitoneal sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda.....	64
Figura 25: Efeito da PDCM, v.o., na atividade locomotora dos animais.....	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Condições cromatográficas utilizadas nas análises em CLAE.....	38
Tabela 2:	Condições cromatográficas empregadas nas análises em CLAE semipreparativa.....	38
Tabela 3:	Amostras provenientes do fracionamento da PDCM por cromatografia flash com os respectivos sistemas de eluição, massa e rendimento.....	49
Tabela 4:	Teor de fenóis e flavonoides na PDCM.....	55
Tabela 5:	Atividade antioxidante de PDCM por meio dos métodos de redução do radical DPPH, fosfomolibidênio e descoramento do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	57
Tabela 6:	Percentual de Inibição (% I) da amostra (PDCM) e BHT para o método do TBA, em relação ao controle negativo.....	58

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

a.C – Antes de Cristo

AA - Ácido Araquidônico

AAS – Ácido Acetilsalicílico

AcEt – Acetato de Etila

AINES - Anti-inflamatório Não Esteróide

ANOVA - Análise de Variância

ATP - Trifosfato de Adenosina

BHA - 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol

BHT - 2,6-diterc-butil-p-cresol

CAT¹ – Catalase

CAT² – Capacidade Antioxidante Total

CBR- Centro de Biologia da Reprodução

CCD - Cromatografia em Camada Delgada

CEEA - Comissão de Ética na Experimentação Animal

CGRP - Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina

CI₅₀ - Concentração Inibitória Média

CLAE - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

COX- Ciclooxygenase

DAD - Detector de Arranjo de Diodos

DL – Dose Letal

DPPH - 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila

EAT - Equivalente a Ácido Tânico

EQ - Equivalente à Quercetina

EPM – Erro Padrão da Média

EBM- Extrato Bruto Metanólico

ERO – Espécies Reativas de Oxigênio

ERN – Espécies Reativas de Nitrogênio

FD – Fração Diclorometano

GABA- Ácido Gama-aminobutírico

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

i.p – Intraperitoneal

IASP - International Association for the Study of Pain

ICAM - Molécula de Adesão Intercelular

IFN – Interferon

IL - Interleucina

Indo – Indometacina

iNOS – Óxido nítrico Sintase Induzida

LB – Linha de Base

LOX - Lipooxigenase

LPS- Lipopolissacarídeo

MAO - Mono-aminooxidase

MDA - Malonaldeído

Mo - Molibdênio

NO - Óxido Nítrico

NOS - Óxido Nítrico Sintase

PAF- Fator de Ativação Plaquetária

PDCM - Partição em diclorometano

PG – Prostaglandina

PHEX - Partição Hexânica

PKC - Proteína Quinase C

PLA2 – Fosfolipase A2

PMNs – Polimorfonucleares

RMN- Ressonância Magnética Nuclear

s.pl. – Subplantar

SB – Sorbax

SNC – Sistema Nervoso Central

SOD - Superóxido Dismutase

SP - Substância P

TBA - Ácido Tiobarbitúrico

TMS – Tetrametilsilano

TNF – Fator de Necrose Tumoral

TPA - 13-acetato de 12-o-tetracanoilforbol

TR – Tempo de Retenção

UV- Ultravioleta

v.o.– Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	A ESPÉCIE <i>Siparuna guianensis Aublet</i>	18
1.2	RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO.....	24
1.3	RESPOSTA INFLAMATÓRIA.....	26
1.4	DOR E NOCICEPÇÃO.....	29
2	OBJETIVOS	33
2.1	OBJETIVO GERAL.....	33
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
3	MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1	MATERIAL VEGETAL.....	34
3.2	PREPARO DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DE <i>S. guianensis</i>	34
3.3	MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS.....	34
3.3.1	Cromatografia Flash	34
3.3.2	Cromatografia em Camada Delgada	35
3.3.3	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	36
3.3.3.1	<i>Isolamento de constituintes químicos de S. guianensis</i>	37
3.4	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS.....	38
3.5	DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES.....	38
3.6	ATIVIDADES <i>IN VITRO</i>	39
3.6.1	Atividade antioxidante	39
3.6.1.1	<i>Método de sequestro de radicais livres – DPPH</i>	39
3.6.1.2	<i>Método do fosfomolibidênio</i>	39

3.6.1.3	<i>Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.....</i>	40
3.7	ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VIVO</i>	41
3.7.1	Animais.....	41
3.7.2	Teste toxicológico agudo.....	41
3.7.3	Atividade anti-inflamatória.....	42
3.7.3.1	<i>Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....</i>	42
3.7.3.2	<i>Modelo de peritonite induzida por LPS.....</i>	43
3.7.4.2	<i>Teste da formalina.....</i>	44
3.7.4.3	<i>Teste da retirada da cauda (Tail-Flick).....</i>	45
3.7.5	Avaliação da atividade locomotora (<i>open-field</i>).....	46
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
4	RESULTADOS.....	48
4.1	FRACIONAMENTO DE PDCM.....	48
4.2	PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PDCM E SUAS FRAÇÕES...	49
4.3	TEOR DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E FLAVONOIDES.....	53
4.4	ATIVIDADES <i>IN VITRO</i>	54
4.4.1	Atividade antioxidante.....	55
4.4.1.1	<i>Método DPPH, fosfomolibidênio e sistema β-caroteno / ácido linoleico.....</i>	54
4.4.1.2	<i>Peroxidação lipídica utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA).....</i>	56
4.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS <i>IN VIVO</i>	57
4.5.1	Teste toxicológico agudo.....	57
4.5.2	Atividade anti-inflamatória.....	60
4.5.2.1	<i>Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton.....</i>	60
4.5.2.2	<i>Modelo de peritonite induzido por LPS.....</i>	60

4.5.3	Atividade antinociceptiva.....	61
4.5.3.1	<i>Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético.....</i>	61
4.5.3.2	<i>Teste da formalina.....</i>	62
4.5.3.3	<i>Teste da retirada da cauda (Tail-Flick).....</i>	64
4.5.4	<i>Avaliação da atividade locomotora (open-field).....</i>	64
5	DISCUSSÃO.....	66
5.2	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES.....	67
5.3	ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	71
6	CONCLUSÃO.....	78

1 INTRODUÇÃO

O ser humano e a natureza exibem íntima relação desde o surgimento da humanidade. O homem sempre buscou na natureza a solução para os mais diversos males, sejam estes de origem física ou espiritual (CRAGG, GROTHAUS, NEWMAN, 2009). É descrito o uso de seus produtos como fonte de alimentos, habitação, utilidades domésticas, meios de transporte, bem como na prevenção e combate a enfermidades (ROCHA et al., 2015). Com relação a esta última aplicação, evidências arqueológicas e relatos datados na pré-história sugerem que a população já detinha conhecimento sobre espécies de plantas utilizadas para fins medicamentosos (BETTEGA et al., 2011; GEORGE et al., 2016; LIMA, DIMENSTEIN, 2006). Exemplo disto é a utilização da papoula, obtida do ópio, pelos sumérios por volta de 5000 a.C., devido a suas propriedades soporíferas e analgésicas (ALMEIDA, MARTINEZ, PINTO, 2017).

Portanto, um breve histórico pode ser traçado com base na descoberta e desenvolvimento de vários medicamentos a partir de plantas. As primeiras substâncias purificadas do reino vegetal foram isoladas no início do século XVIII. Neste século e no decorrer do século seguinte, são relatados trabalhos de extração, principalmente de ácidos orgânicos e de alcaloides. Foram catalogados nesta época também, o isolamento da morfina (1806), estriquinina e quinina (1820) (ALMEIDA, MARTINEZ, PINTO, 2017). Esta última, obtida em 1820 a partir das cascas secas de *Cinchona*, durante quase trezentos anos, foi o único princípio ativo eficaz contra a malária (DE OLIVEIRA, SZCZERBOWSKI, 2009). Outro marco a ser citado é a descoberta dos salicilatos obtidos de *Salix alba*, que revolucionou o mercado farmacêutico com a posterior síntese do ácido acetilsalicílico (AAS), um ácido orgânico com propriedades analgésicas e anti-inflamatórias reconhecidas (ALMEIDA, MARTINEZ, PINTO, 2017; MC CURDY, SCULLY, 2005). Nos últimos anos, o interesse nas terapias alternativas e no uso terapêutico de produtos naturais tem crescido ainda mais, principalmente na descoberta de novos agentes antitumorais (LALL, KISHORE, 2014; TABASSUM, et al., 2014). Dentre alguns destes medicamentos, destacam-se os alcaloides antileucêmicos vincristina e vimblastina, isolados de *Catharanthus roseus*, os diterpenos taxol e docetaxel de *Taxus brevifolia* e os alcaloides camptotecina, topotecan e irinotecan de *Camptotheca acuminata* (CRAGG, GROTHAUS, NEWMAN, 2009; NEWMAN, CRAGG, 2012).

Mais recentemente, em 2015, o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina foi atribuído a pesquisadores de duas terapias a partir de produtos naturais, a avermectina, um antiparasitário derivado do cultivo de bactérias do solo, e a artemisinina, um antimalárico desenvolvido a partir da espécie *Artemisia annua* (GEORGE et al., 2016).

Dados atuais relatam que o mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano. No Brasil, estima-se que este comércio seja da ordem de 5% do mercado total de medicamentos, avaliado em mais de US\$ 400 milhões (MARTINAZZO et al., 2015).

O território brasileiro é propício para os estudos dessa natureza, em virtude de seu litoral, de sua flora e detenção da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta (CARNEIRO et al., 2015). De acordo com a Convenção de Diversidade Biológica, o país detém 15% a 20% de toda a biodiversidade mundial e é tido como o de maior endemismo vegetal do mundo. São 55 mil espécies vegetais e destas, estima-se que só a floresta amazônica disponha de 25 a 30 mil espécies (BARREIRO, BOLZANI, 2009; RODRIGUES, ALMEIDA, PIRES, 2010).

A história da utilização de plantas medicinais no país remonta à época da colonização, apresentando influências da cultura, indígena, africana e europeia. Os índios que aqui viviam já utilizavam grande quantidade de plantas medicinais e, por intermédio dos pajés, este conhecimento e seus usos foram transmitidos com o passar das gerações. A influência africana se deve à vinda de escravos para o Brasil no período colonial, que junto consigo trouxeram espécies vegetais usadas em seus países de origem. E por fim, os europeus que aqui chegaram se depararam com estes conhecimentos já consolidados e aqueles que passaram a viver no país sentiram a necessidade de viver do que a natureza lhes tinha a oferecer, utilizando a flora brasileira para fins alimentares e medicamentosos (TOMAZZONI, NEGRELLE, CENTA, 2006).

Dados científicos toxicológicos sobre plantas medicinais são limitados. A premissa de que o uso tradicional de uma planta por centenas de anos estabelece que sua segurança não é verdadeira, carecendo de estudos que confirmem este uso popular, bem como os princípios ativos relacionados e sua segurança farmacológica (AMARANTE et al., 2011; ARGENTA et al., 2011; LUNA et al., 2005).

Desta forma, com o propósito de colaborar com estudos de caracterização e utilização de moléculas bioativas, o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, vem atuando no desenvolvimento de pesquisas relacionadas à prospecção de novas moléculas e extratos vegetais bioativos, bem como à avaliação de relevantes atividades biológicas e estudos de segurança. Uma das espécies que tem seu potencial químico e farmacológico investigado é *Siparuna guianensis* Aublet.

1.1 A ESPÉCIE *Siparuna guianensis* Aublet.

O gênero *Glossocalyx*, juntamente com o gênero *Siparuna*, compõem a família Siparunaceae. O primeiro, nativo na África Ocidental, conta apenas com uma espécie reconhecida. O gênero *Siparuna*, por sua vez, ocorre desde o México ao norte da América do Sul até a Bolívia e Paraguai, tendo 72 espécies integrantes (MONTANARI, 2010).

A espécie *Siparuna guianensis* Aublet. (figura 1) é um arbusto ou árvoreta monoico com altura de 5 a 10 metros, seu tronco é marrom e cilíndrico, (SIMAS et al., 2001) suas folhas são simples, alongadas a elípticas, opostas, membranáceas e de margens lisas (VALENTINI^a et al., 2010). Os frutos são múltiplos cupuliformes, globosos e densamente cobertos com pêlos estrelados, apresentam cor verde quando jovens e vinho quando maduros que se abrem expondo o interior róseo-avermelhado com as sementes (VALENTINE^b, RODRIGUEZ, COELHO, 2010).

Figura 1: Folhas (A) e frutos (B) da espécie *Siparuna guianensis*



Fonte: ACERVO PESSOAL

É uma espécie nativa do Brasil com disseminada distribuição geográfica, pode ser identificada em todos os estados do território brasileiro, com exceção de Santa Catarina e Rio Grande do Sul (FLORA DO BRASIL 2020, 2017). Suas denominações populares variam de acordo com a região que é encontrada. No sudeste, sul e centro-oeste é conhecida como negramina, capitu e marinheiro, no norte, além de capitu, é nomeada como erva-santa e limão-bravo (FACUNDO et al., 2012; FLORA DO BRASIL 2020, 2017). Na literatura como sinônimas são descritas as seguintes espécies: *Angelina divergentifolia* Pohl ex Tul., *Citrosma guianensis* (Aubl.) Tul., *Citrosma guianensis* f. *divergentifolia* Pohl. ex Tul., *Citrosma guianensis* var. *divergentifolia* (Pohl. ex Tul.) Tul., *Citrosma guianensis* f. *nuda* Tul., *Citrosma guianensis* var. *nuda* (Tul.) Tul., *Citrosma camporum* Tul., *Citrosma discolor* Poepp. & Endl., *Citrosma oligocarpa* Mart. ex A.DC., *Siparuna guianensis* var. *divergentifolia* (Pohl. ex Tul.) A. DC., *Siparuna guianensis* var. *glabrescens* A. DC., *Siparuna guianensis* var. *longifolia* A. DC., *Siparuna guianensis* var. *nitens* Kuntze, *Siparuna archeri* A.C. Sm., *Citrosma oligocarpa* Mart. ex A.DC., *Siparuna arianae* V. Pereira, *Siparuna camporum* (Tul.) A. DC., *Siparuna cavalcantei* Jangoux, Jacques Ivan G., *Siparuna discolor* (Poepp. & Endl.) A.DC., *Siparuna duckeana* Jangoux, Jacques Ivan G., *Siparuna foetida* Barb.Rodr., *Siparuna itacaiunensis* Jangoux, Jacques Ivan G., *Siparuna panamensis* A.DC., *Siparuna svanicola* Jangoux, Jacques Ivan G. (THE PLANT LIST, 2013).

Levando em consideração que os saberes tradicionais constituem um importante referencial para experimentos relacionados ao uso e aproveitamento de drogas de origem vegetal, *S. guianensis* está inserida neste contexto sendo uma espécie comumente usada na medicina popular brasileira e em outros países. Na Colômbia, o macerado aquoso da casca de seu caule é usado na forma de banho para doenças de pele. Além disso, uma infusão das folhas é usada da mesma forma a fim de "limpar" o corpo (LOPEZ, HUDSON, TOWERS, 2001). Na Guiana Francesa, suas folhas são usadas popularmente em distúrbios inflamatórios por meio da ingestão do decocto e na higiene genital feminina através de banhos (TAREAU, PALISSE, ODONNE, 2017). Neste mesmo país, na região amazônica, as folhas de *Siparuna guianensis* e *Siparuna pachyantha* são utilizadas por crioulos e índios Wayãpi contra a malária e febres, e por índios Palikur como cataplasma para propósitos anti-inflamatórios (CÉLINE et al., 2009). No Suriname espécies vegetais, dentre elas *S. guianensis*, são utilizadas na prática conhecida como "dry sex" em que mulheres africanas preparam um banho de assento com as espécies, permitindo que os

vapores entrem em contato com seus genitais. Esta técnica leva à diminuição da secreção vaginal e à contração da mucosa, garantindo, segundo elas, uma maior satisfação sexual de seus parceiros. Além disto, foi relatado o uso destes banhos de assento para higienizar o úteros após ciclos menstruais e partos (VAN ANDEL et al., 2008). Ainda no Suriname, a espécie é usada para febre em crianças e para fins espirituais, “evitar o mal” (VAN’T KLOOSTER, VAN ANDEL, REIS, 2016). No Panamá, uma infusão com água quente e folhas de *S. guianensis* é ingerida em casos de lesões e espasmos musculares, além de dores reumáticas (GUPTA et al., 1979). Este último uso é amplamente difundido no Brasil, principalmente na região centro-oeste e norte. No estado do Mato Grosso é relatado o uso do decocto das folhas da espécie como banho tópico para sintomas de sinusite, febre, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina”, que é dita como uma dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol, que pode provocar corrimento de sangue nasal (ANDRADE et al., 2013). A população quilombola deste estado cita o uso de um tradicional cigarro da região, conhecido como “tira-capeta”. Este é usado a fim de reduzir o estresse e, inclusive, por crianças e adolescentes com o propósito de melhorar o desempenho nas habilidades de aprendizagem. É confeccionado a partir de uma mistura de espécies vegetais e, dentre elas, encontra-se *S. guianensis* (NEGRI, RODRIGUES, 2010). Na região amazônica, a espécie é empregada contra febre, inflamação, dor de cabeça, distúrbios digestivos e malária (TEMPONE et al., 2005). Índios amazônicos da tribo Jammadi utilizam as folhas de *S. guianensis* na forma de chá para dores reumáticas (LEITÃO et al., 1999). No trabalho realizado por Santos e colaboradores (2012), são levadas em consideração as práticas terapêuticas exercidas pela população ribeirinha no Amazonas, dentre elas podemos citar o uso de *S. guianensis* para fins orexigênico, alucinógeno, ansiolítico, estimulante sexual, cefaleia e em formulações cicatrizantes. Além dos usos terapêuticos, também é citado seu emprego contra desordens espirituais como quebrantes, panema e vento-caído. Índios da tribo Yanomami descrevem o uso da espécie por meio da trituração e inalação do aroma liberado pelas folhas, assim as mesmas são friccionadas contra a cabeça aliviando uma série de desordens, incluindo congestionamento nasal, resfriados, tonturas e náuseas (MILLIKEN, ALBERT, 1996). Em um estudo abordando as práticas de benzedores e parteiras em uma comunidade no estado do Paraná, *S. guianensis* foi citada juntamente a outras espécies para o preparo de uma bebida denominada “amargoso”. Esta, seria uma bebida com características místicas e curativas. A população caiçara local a ingere antes de entrar na mata, a fim de se protegerem contra picadas de cobra, mal este, que seria dificilmente remediável devido a

distância da comunidade de atendimentos médicos (MUNIZ, SILVA, 2016). A população indígena habitante do Equador, os Waorani, descrevem o uso do fruto, que juntamente com as folhas maceradas ao serem colocados em contato com o rosto e cabeça, tratam dores e febre (DAVIS, YOST, 1983). Por fim, em um trabalho cujo objetivo foi abordar as condições de saúde da mulher nas diferentes culturas, o uso das folhas de *S. guianensis* foi contra-indicado durante a gravidez, sendo seu chá utilizado, inclusive, para fins abortivos (YAZBEK et al., 2016).

Além de seu extenso uso popular, estudos já realizados com *S. guianensis* têm demonstrado potencial biológico da espécie. Lopez, Hudson e Towers (2004), avaliaram o potencial antimicrobiano do extrato metanólico da espécie e verificaram ação antimicrobiana frente a cepas de *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Mycobacterium phlei*. O óleo essencial das folhas de *S. guianensis* apresentou boa atividade antimicrobiana contra *Streptococcus mutans* e atividade antituberculose, principalmente relacionada a *Mycobacterium avium* (MELO et al., 2017). No trabalho de Andrade e colaboradores (2015), foram avaliadas as atividades antibacteriana, antifúngica e tripanocida do óleo das folhas. Foi constatada uma melhor atividade sobre os fungos, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* e *Penicillium commune*, do que sobre as bactérias. Quanto à atividade tripanocida, a amostra não foi efetiva (ANDRADE et al., 2015). Ainda, com relação à atividade tripanocida, Tempone e colaboradores (2005) verificaram atividade da fração alcaloídica das folhas de *S. guianensis* frente ao protozoário *Trypanosoma cruzi*.

A espécie também foi estudada quanto a outras atividades anti-parasitárias. Foi encontrada atividade leishmanicida para o óleo essencial das folhas (ANDRADE et al., 2016) e atividade anti-malárica frente ao *Plasmodium falciparum* para a fração alcaloídica e extrato etanólico em um outro estudo (FISCHER et al., 2004). O óleo essencial das folhas, caule e frutos demonstraram significativa atividade inseticida ao inibir todos os estágios de desenvolvimento do *Aedes aegypti* e *Culex quinquefasciatus*, ou seja, exibiu ação ovicida, larvicida, pupicida e adulticida, além de atividade repelente para estas mesmas espécies no estágio adulto (AGUIAR et al., 2015). O óleo das folhas foi eficiente também no controle de pragas responsáveis por danos em colmeias de abelha como *Galleria mellonella* e *Achroia grisella*, espécies de traça (FERREIRA et al., 2017).

Por fim, óleo das folhas de *S. guianensis* foi avaliado quanto sua atividade antioxidante, exibindo pouca ação no modelo do β -caroteno/Ácido linoleico e nula no modelo do DPPH (ANDRADE et al., 2013). E o extrato hidroetanólico quando testado para fins cicatrizantes também não exibiu ação (THOMÉ et al., 2012).

Em relação à produção e caracterização do óleo essencial, a espécie apresenta alteração na sua composição em diferentes regiões geográficas no mesmo país, e dentro da mesma região, de acordo com as estações do ano.

Melo e colaboradores (2017) avaliaram a composição química do óleo das folhas de *S. guianensis* coletadas em Minas Gerais e encontraram como principais componentes o monoterpeno β -mirceno e os sesquiterpenos germacreno-D, E-farnesol e siparunona. Outro estudo realizado também no estado de Minas Gerais encontrou semelhança na constituição do óleo essencial, identificando como principais componentes o β -mirceno, germacreno-D e biciclogermacreno (ANDRADE et al., 2015). No mesmo estado, na cidade de Tocantins, um estudo da composição do óleo das folhas desta espécie demonstrou a predominância de α -terpinoleno e α -bisabolol ao longo de todo o ano (MONTANARI, 2010). Este resultado é contraditório ao encontrado no estudos de Melo e colaboradores (2017) em que o α -bisabolol foi detectado em pequenas quantidades.

Em São Paulo, Fischer e colaboradores (2005) analisaram a constituição do óleo das folhas e fruto. Como constituintes principais foram identificados o ácido decanoico, 2-undecanona e β -pineno para o primeiro e 2-undecanona, β -pineno e limoneno para o segundo.

No estado do Tocantins, os principais componentes caracterizados no óleo das folhas foram β -mirceno e 2-undecanona, no caule β -mirceno, δ -elemene, germacreno D, α -limoneno e biciclo-germacreno e no fruto 2-tridecanona e 2-undecanona (AGUIAR et al., 2015). Em um outro estudo realizado no Tocantins, 2-tridecanona e 2-undecanona foram os principais constituintes identificados no óleo essencial das folhas de *S. guianensis*. Em um terceiro estudo neste estado, β -mirceno e 2-undecanona foram as principais substâncias identificadas (PORTELLA et al., 2014).

Os óleos essenciais de *S. guianensis* obtidos de plantas coletadas em diferentes regiões da Amazônia também apresentaram diferenças na sua constituição. Em uma amostra de óleo essencial coletada no Pará, os constituintes majoritários foram epi- α -

bisabolol e espatulenol. Em outra amostra de óleo coletada no mesmo estado verificou-se presença de atractilona, germacrona e germacrene-D como compostos majoritários. No Acre, espatulenol, selin-11-en-4 α -ol, β -eudesmol e elemol foram os principais constituintes (ZOGHBI et al., 1998). No estado do Amazonas, a caracterização do óleo das folhas permitiu a identificação do β -mirceno, 2-undecanona e bicogermacreno (DE BESSA et al., 2015).

As variações na composição química dos óleos essenciais extraídos de uma espécie ocorrem frequentemente, uma vez que a produção de metabolitos secundários é fortemente influenciada pelo ambiente em que a espécie é inserida. Os fatores responsáveis por tais variações são sazonalidade, disponibilidade de nutrientes, temperatura, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, altitude, composição atmosférica e ataque de patógenos e herbivoria (VALENTINI^a et al., 2010).

Além do estudo dos óleos essenciais de *S. guianensis*, outras amostras permitiram a identificação de substâncias químicas na espécie. Braz e colaboradores (1976) obtiveram com extrato benzênico do tronco da espécie, os fitosteroides β -sitosterol, estigmasterol e os alcaloides oxoporfínicos. No extrato etanólico das folhas de *S. guianensis* coletadas em Rondônia foram identificados dois flavonoides derivados do canferol: canferol-3,7-dimetileter e canferol-3,7,4'-trimetileter (FACUNDO et al., 2012). Negri, Santi e Tabach (2012) também identificaram no extrato hidroetanólico os flavonoides leucenina-2, vicentina-2, quercetina e derivados da quercetina (quercetina-3-O-rutinosídeo-7-O-ramnosídeo, quercetina-3-O-pentosilpentosídeo-7-O-ramnosídeo, quercetin-3,7-di-O-ramnosídeo e quercetina-3-O-pentosilramnosídeo-7-O-ramnosídeo), derivados do canferol (canferol-3-O-pentosilpentosídeo-7-O-ramnosídeo, canferol-3,7-di-O-ramnosídeo) e um dímero da procianidina B1. No extrato em acetato de etila das folhas também foram identificados flavonoides como a rutina, quercetina, canferol e derivados glicosilados da quercetina como ramnosil-quercetina, quercetina-3-O-glucopiranosil-ramnosídeo, quercetina-7-O-glucopiranosil-ramnosídeo, quercetin-7-O-rutinosídeo e canferol e seu derivado monoglicosilado (ramnosyl-canferol) (LEITÃO et al., 2005). Por fim, ao analisar o extrato metanólico dos frutos de *S. guianensis*, foi possível identificar um derivado glicosilado do sitosterol (glucosil-sitosterol), e os alcaloides nantenina, liriodenina, n-metil laurotetanina, norglaucina, assimilobina e anonaina (FACUNDO et al., 2012).

1.2 RADICAIS LIVRES E ESTRESSE OXIDATIVO

Os radicais livres são definidos como qualquer substância ou fragmentos desta contendo um ou mais elétrons desemparelhados em sua camada de valência, o que lhe confere alta instabilidade e reatividade. Em sistemas biológicos, as espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN) são os principais radicais livres responsáveis por danos a biomoléculas, como ácidos nucleicos, proteínas, lipídeos e carboidratos. Dentre estas, algumas espécies derivadas do oxigênio são o ânion radical superóxido, radical hidroxila, perhidroxila, alcóxila, peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e hidroperóxidos orgânicos. De maneira correlata, as espécies derivadas do nitrogênio incluem óxido nítrico, dióxido de nitrogênio e peroxinitrito (BORGES, et al. 2013; BURTON, JAUNIAUX, 2011; SOFFLER, 2007).

Espécies reativas são partes integrantes do metabolismo, sendo observadas em diversas condições fisiológicas. As mitocôndrias são consideradas a principal fonte endógena das mesmas. Acredita-se que a transferência de elétrons que ocorre durante a cadeia respiratória não seja totalmente eficiente, permitindo que cerca de 1 a 5% dos elétrons sejam direcionados diretamente ao oxigênio gerando formas parcialmente reduzidas de O_2 . Esta taxa pode encontrar-se elevada em algumas condições como glicemia elevada, hiperóxia e, até mesmo, hipóxia (BURTON, JAUNIAUX, 2011). Além das mitocôndrias, outra fonte endógena de espécies reativas são células do sistema imune, como neutrófilos e macrófagos que, quando ativados, aumentam o metabolismo de oxigênio desencadeando a formação de ânion superóxido, óxido nítrico e peróxido de hidrogênio. Neste caso, as EROs exercem papéis fisiológicos em vias de sinalização pró-inflamatórias, morte celular e defesa (SOFFLER, 2007; BURTON, JAUNIAUX, 2011; GULCIN, BEYDEMIR, 2013). O óxido nítrico é formado a partir da ação da enzima óxido nítrico sintase, por meio da reação do aminoácido L-arginina e oxigênio. Esta molécula é de grande importância no processo de sinalização celular, além de estar envolvida no aumento do tônus muscular, adesão celular e função renal (RANG et al., 2016).

Portanto, as espécies reativas fazem parte da vida aeróbia sendo de suma importância a manutenção de seus níveis fisiológicos, de modo a garantir a homeostase do organismo. Esta função é desempenhada por sistemas antioxidantes enzimáticos e não-enzimáticos, que são responsáveis por minimizar, ou até mesmo inibir, de maneira eficaz

a oxidação de um determinado substrato. Exemplos de antioxidantes enzimáticos incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase, enquanto que a segunda classe é representada por moléculas de baixo peso molecular como α -tocoferol, ácido ascórbico, selênio, glutathione e alguns compostos fenólicos (BURTON, JAUNIAUX, 2011; GONZALEZ-BURGOS, GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; YADAV, YADAV, YADAV, 2014).

No entanto, algumas condições podem ocasionar um desequilíbrio entre substâncias pró-oxidantes e antioxidantes em favor da primeira, levando ao chamado estresse oxidativo. Deficiências nas enzimas antioxidantes, como polimorfismos, podem causar redução ou inibição da atividade das mesmas, alterando o equilíbrio. De maneira contrária, condições patológicas como aterogênese, carcinogênese ou inflamações crônicas em que fagócitos permanecem continuamente ativos também alteram a homeostase (BURTON, JAUNIAUX, 2011; GULCIN, BEYDEMIR, 2013; SOFFLER, 2007). Por fim, fatores externos como exposição a altas concentrações de poluentes, substâncias tóxicas e xenobióticos acarretam, da mesma forma, um quadro de estresse oxidativo (BURTON, JAUNIAUX, 2011).

Uma solução para atenuar este ambiente desfavorável é a suplementação dietética com compostos antioxidantes. Sua aplicação engloba a medicina preventiva e, muitas vezes, a terapia indireta, auxiliando no tratamento de doenças em que o estresse oxidativo já está instalado. Neste contexto, a pesquisa por estes compostos tendo como fonte produtos naturais aumentou significativamente nos últimos anos, isto porque a segurança de antioxidantes sintéticos, como 2,6-diterc-butil-p-cresol (BHT) e 2,3-terc-butil-4-hidroxianisol (BHA), tem sido questionada. Estudos vêm mostrando elevada toxidez desses compostos devido a sua difícil metabolização no organismo, podendo resultar em dano hepático e carcinogênese. Além do que, um balanço positivo é alcançado entre a ingestão de fontes de antioxidantes naturais e a incidência de doença nos seres humanos (KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2011; SONG et al., 2010; WOJTUNIK, CIESLA, WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2014).

1.3 RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A reação inflamatória é um mecanismo que consiste em respostas celulares e vasculares que são desencadeadas a fim de erradicar patógenos, danos físicos, químicos e, até mesmo, traumas, evitando a disseminação da injúria a outras regiões do organismo, reestabelecendo sua homeostasia (ASHLEY, WEIL, NELSON, 2012).

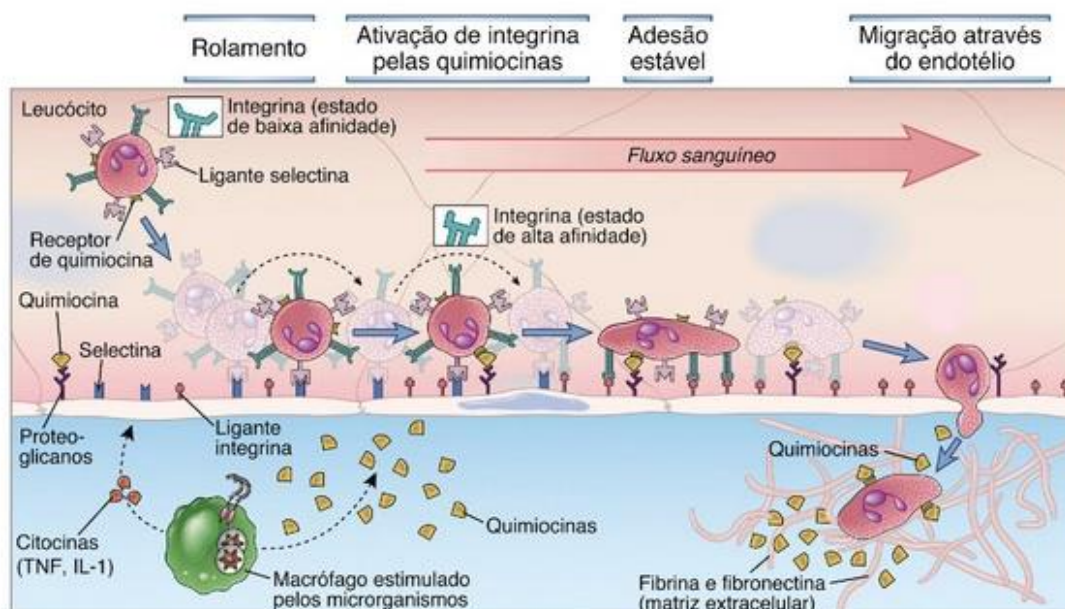
No geral, é descrita por 5 sinais característicos: rubor, edema, calor, dor e perda da função do tecido ou órgão lesado. O primeiro se refere ao aumento do fluxo sanguíneo no local da lesão devido à dilatação dos pequenos vasos. O edema, por sua vez, ocorre devido ao extravasamento de fluidos e aumento da permeabilidade vascular para que as células do sistema imune atinjam a lesão. Esse conjunto de ações leva ao aumento da temperatura local desencadeando o terceiro sinal, calor. A dor decorre da compressão de fibras aferentes pelo edema e da formação de mediadores pró-inflamatórios, como prostaglandinas e bradicinina, que sensibilizam nociceptores locais. Finalmente, a perda de função está relacionada à cronicidade do processo (COLACITE, 2015; SERHAN, SAVILL, 2005).

Como já mencionado neste tópico, respostas celulares e vasculares estão envolvidas no desenrolar da cascata inflamatória. As células envolvidas incluem polimorfonucleares (PMNs), linfócitos, plaquetas e células endoteliais. Ao serem ativadas, liberam uma infinidade de mediadores pró-inflamatórios incluindo citocinas, principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF- α), quimiocinas, mediadores lipídicos, dentre os quais estão as prostaglandinas, leucotrienos, fator de ativação plaquetária (PAF), assim como substâncias vasoativas, por exemplo, histamina, serotonina e óxido nítrico (LAWRENCE, GILROY, 2007; NATHAN, 2002; RANG et al., 2016).

Alterações hemodinâmicas são proporcionadas por alguns destes mediadores viabilizando o deslocamento de leucócitos. Neste momento ocorre a marginalização destas células devido a interações fracas com moléculas de adesão (selectinas) agora expressas nas paredes dos vasos. O evento subsequente é caracterizado por uma adesão coesa, a partir de moléculas de adesão do tipo I (ICAM-I) no endotélio e integrinas em leucócitos, permitindo a transmigração dos mesmos para o tecido (diapedese). Por fim, essas células atingem a lesão por estímulo quimiotático (ASHLEY, WEIL, NELSON, 2012; RANG et al., 2016).

No local, leucócitos dão início à fagocitose de patógenos, gerando espécies reativas de oxigênio (ROS), dor e aumento na expressão de determinadas enzimas, por exemplo, fosfolipase A2 (PLA2), 5-lipoxigenase (5-LOX), COX e óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (figura 2). Neutrófilos são o tipo celular predominante nos estágios iniciais da resposta. Caso o processo persista, ocorre pronunciada migração de células mononucleares (monócitos e linfócitos) para o local, modificando o padrão de celularidade prevalente (COLACITE, 2015; IWALEWA et al., 2007).

Figura 2: Esquema inicial da resposta inflamatória. Expressão de selectinas e integrinas na superfície de polimorfonucleares, permitindo a interação dos mesmos com o endotélio vascular, seguido da passagem destes para o tecido, a fim de combater a injúria.



Fonte: ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2015

Os processos inflamatórios podem ser classificados em agudos ou crônicos. Idealmente, quando o tecido ou órgão recupera-se dos mecanismos anteriormente mencionados sem o surgimento de sequelas ou maiores danos, o quadro é considerado como agudo. Caso contrário, o processo é considerado crônico. Neste caso, o fator de risco continua a existir e a resposta inflamatória é persistente ocorrendo alteração na celularidade, marcada pela presença de linfócitos e monócitos, presença de fenômenos produtivos como proliferação de vasos e fibroblastos, podendo levar a fibrose do local e/ou até mesmo perda da função (COLACITE, 2015; FERRERO-MILIANI et al., 2007; GILROY et al., 2004; NATHAN, 2002). A inflamação crônica é a gênese de diversas

doenças como a artrite reumatoide, câncer, asma e doenças auto-imunes, por exemplo (BARNES, 2006).

A terapia anti-inflamatória tem por base o emprego de AINEs (seletivos e não seletivos) e glicocorticoides. A ação do primeiro grupo consiste na inibição da COX. Esta enzima possui 3 isoformas, COX-1 (constitutiva), COX-2 (induzida), COX-3, que são responsáveis pela metabolização do ácido araquidônico (AA) em prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos. Deste modo, com sua inibição não há formação das prostaglandinas, que são metabólitos inflamatórios. A grande limitação dos AINEs está em seu efeito farmacológico ocorrer à base de efeitos colaterais graves, decorrentes da inibição não-seletiva da COX-1, responsável pela produção de prostaglandinas fisiológicas com ação em nível gastrointestinal e renal (ALWANI et al., 2006; RANG et al., 2016). Suceder, seu uso prolongado leva a efeitos adversos associados a lesões gástricas, hemorragias, ulcerações, além de falência renal (SOSTRES et al., 2010; RANG et al., 2016). Uma alternativa seria os inibidores seletivos da COX-2, porém estudos sugerem um aumento na formação de tromboxanos através da COX-1, aumentando a possibilidade de complicações cardiovasculares (RAO, KNAUS, 2008). O segundo grupo, glicocorticoides, são fármacos que atuam em receptores intracelulares que desencadeiam a repressão ou indução de genes particulares. Seus efeitos finais incluem a inibição da PLA2, enzima responsável pela formação de AA a partir de lipídeos de membranas (fosfolipídio), assim a formação de prostaglandinas, leucotrienos e outros metabólitos do AA é reduzida. Também inibem a produção de citocinas pró-inflamatórias, expressão de moléculas de adesão além de outros mecanismos (RANG et al., 2016). Entre efeitos adversos estão imunossupressão, osteoporose, retenção de líquidos, predisposição ao desenvolvimento de úlceras gástricas, entre outras complicações (WHITEHOUSE, 2011).

Portanto, os efeitos adversos associados aos medicamentos atuais existem e, muitas das vezes, podem se sobrepor a

os efeitos farmacológicos, inviabilizando a adesão ao tratamento. Desta forma, a busca por terapias anti-inflamatórias alternativas é necessária. Os produtos naturais vêm ganhando espaço nessa área, estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais (COUTINHO, MUZITANO, COSTA, 2008).

1.4 DOR E NOCICEPÇÃO

Apesar dos conhecimentos de propagação neuronal da dor, esta é de difícil definição devido à complexidade de sua resposta e experiência subjetiva em cada indivíduo. A utilização do termo “dor” é uma particularidade que diz respeito a seres humanos pois, além de levar em consideração o componente sensitivo e neurofisiológico, é necessário agregar o componente emocional, que leva em consideração as experiências e quadros dolorosos de cada indivíduo (COUTAUX et al., 2005; RANG et al., 2016). Ou seja, diferentes indivíduos apresentam diferentes percepções de dor, o que salienta seu caráter subjetivo. Sua compreensão só é possível a partir do relato de quem é afligido por ela, tornando difícil sua mensuração (ELLER, JAQUES, 2006).

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, do inglês International Association for the Study of Pain (IASP), o conceito de dor é definido como uma experiência sensorial, ou até mesmo emocional, desagradável devido a um dano tecidual real ou potencial (MERSKEY, BOGDUK, 1994). Termo este que deve ser diferenciado de nocicepção, o qual diz respeito a manifestações neurofisiológicas, transdução, transmissão e modulação do estímulo, pela ativação de nociceptores, exclusivamente em consequência de lesões tissulares. Desta forma, conclui-se que nem todos os estímulos nociceptivos podem ser qualificados como dor (JESSEL, KELLY, 2012; KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008). Nesse contexto, ensaios em animais para avaliação de fármacos ou possíveis substâncias com caráter antinociceptivo determinam a nocicepção e envolvem a avaliação comportamental dos animais a um estímulo doloroso (LOESER, MELZACK, 1999; RANG et al., 2016).

A presença de um estímulo nocivo real ou potencial, quer seja de origem química, térmica ou mecânica, é capaz de ativar os chamados nociceptores. Estes, por sua vez, encontram-se associados a fibras aferentes primárias que estão relacionadas com a transdução dos sinais elétricos e podem ser distinguidas de acordo com a presença ou ausência de mielina e seus respectivos diâmetros, como do tipo A β , fibras A δ e fibras C (JULIUS, BASBAUM, 2001).

A primeira classe tem a característica de ser mielinizada e de grande diâmetro, respondendo a estímulos inócuos como tato, vibração e pressão, ou seja, não contribuem para a nocicepção. Já as fibras A δ são mielinizadas, com diâmetro e velocidade de condução menor, estão envolvidas nas primeiras reações ao estímulo agressor e a resposta

gerada é rápida, forte e caracterizada por sensações de picada e/ou ferroadas. Por fim, as fibras do tipo C são amielinizadas, de diâmetro pequeno e condução lenta, e encontram-se estimuladas em reações posteriores de dor, como em casos de dor crônica, tendo caráter difuso e persistente (JULIUS, BASBAUM, 2001; KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

Sendo assim, quando um tecido é lesionado, os nociceptores são ativados devido à liberação de mediadores, como o glutamato, neuropeptídios, como a substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), o trifosfato de adenosina (ATP), o óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), dentre outros (MILLAN, 2002; VERGNOLLE, 2008). E a partir deste estímulo, essas fibras alcançam a medula espinhal até a substância cinzenta no corno dorsal, onde são formadas conexões sinápticas que atingem o tálamo ou outros sistemas ascendentes gerando respostas afetivas e sensorial-discriminativas da dor (CARR, GOUDAS, 1999; RANG et al., 2016). Simultaneamente, vias descendentes exercem forte controle inibitório sobre a propagação do impulso doloroso. A partir do mesencéfalo partem estímulos que se dirigem para o núcleo magno da rafe, de onde fibras eferentes chegam à medula espinhal com o intuito de inibir as descargas dos neurônios das vias aferentes. Dentre os transmissores responsáveis pelo controle descendente da dor encontram-se a noradrenalina, serotonina, acetilcolina, ácido gama-aminobutírico (GABA), dopamina, encefalina, dentre outros. Sendo a noradrenalina e serotonina os principais e mais estudados neurotransmissores das vias descendentes (MILLAN, 2002; RANG et al., 2016).

É importante salientar que, sempre que houver qualquer estímulo nocivo, o organismo reagirá a fim de desencadear uma resposta dolorosa como um mecanismo de proteção (GUYTON, HALL, 2002; MILLAN, 2002). Quanto a sua origem, a dor pode ser classificada em aguda e crônica. A primeira está vinculada a lesões e traumas pós-operatórios, atingindo 1 em cada 5 adultos. Sua persistência pode afetar a homeostasia gerando aumento de disfunções orgânicas que são prejudiciais ao paciente, como hipoventilação, aumento do trabalho cardíaco e contração muscular reflexa. Assim, de acordo com sua severidade, pode ser fator de risco para ataques cardíacos, pneumonia e distúrbios no processo de coagulação sanguínea (CALIL, PIMENTA, 2005; GOLDBERG, MCGEE, 2011).

Quando a persistência da dor é superior a 3 meses, considera-se como um processo crônico. Este é um problema de saúde pública e atinge em torno de 15% da população mundial, sendo a maior prevalência em mulheres que apresentam patologias músculo esquelética, promovendo alto custo para os sistemas de saúde (GOLDBERG, MCGEE, 2011; OLESEN et al., 2012). Suas sequelas são de alta gravidade incluindo, mas não se limitando, a depressão, dificuldade nas relações sociais e incapacidade de trabalho. As principais patologias associadas são: câncer, osteoartrite, artrite reumatoide e problemas de coluna (GOLDBERG, MCGEE, 2011).

Em países desenvolvidos, há um gasto anual de US\$ 1 trilhão por ano. Nestes a prevalência gira em torno de 30% de pacientes que relatam a presença de dor crônica, permanecendo com a mesma, em média, 7 anos (CIPRIANO, DE ALMEIDA, VALL, 2011).

Portanto, o alívio da dor é uma prioridade terapêutica, pois representa grande sofrimento e desgaste emocional para o paciente, o que afeta substancialmente sua qualidade de vida. Além disso, é um sintoma de fundamental importância para estabelecer o diagnóstico de diversas doenças, pois é através dela que muitas afecções se manifestam (PIMENTA et al., 1998; GOLDBERG, MCGEE, 2011).

As terapias medicamentosas hoje propostas para o alívio do processo doloroso se baseiam basicamente no uso de analgésicos periféricos, que são representados pelos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), e os analgésicos de ação central, principalmente os opioides. A primeira classe é empregada em casos de dor aguda e em esquemas terapêuticos associados à segunda classe em dores crônicas. Os opioides, por sua vez, são utilizados em casos de dor crônica, como dor neuropática, em que a terapia com AINES se tornou ineficaz (MOORE, 2009). A necessidade de terapias alternativas se baseia no fato de que a Aspirina e Morfina são os medicamentos mais utilizados há mais de um século, trazendo, muitas das vezes, efeitos adversos aos pacientes, o que impossibilita o sucesso do tratamento (KISSIN, 2010).

Portanto a busca por terapias alternativas é incessante, e os produtos naturais encontram-se inseridos neste âmbito. Exemplo disto é a contribuição de espécies vegetais no desenvolvimento de drogas analgésicas usadas atualmente. A morfina pode ser citada com propriedade neste aspecto. Este alcaloide isolado a partir do ópio extraído de *Papaver somniferum* (Papaveraceae) não é apenas o mais antigo, mas a substância mais

eficaz no controle da dor na clínica. Outro exemplo, explanado anteriormente na introdução deste trabalho, é o ácido acetilsalicílico, sintetizado a partir do ácido salicílico, constituinte este extraído de espécies do gênero *Salix* (Salicaceae) e que é o medicamento protótipo da classe dos AINES. Por fim, cabe citar neste momento a cafeína. Extraída de várias espécies de grãos de café (Rubiaceae), é uma das substâncias mais utilizadas no mundo em vários aspectos e, para fins terapêuticos, tem sido empregada juntamente com outras drogas, AINES, no tratamento da enxaqueca e outras condições que têm como característica a dor (CALIXTO et al., 2000).

Concluindo, *Siparuna guianensis* é uma das espécies vegetais que vem sendo estudadas por nosso grupo. Com base em estudos etnofarmacológicos, a espécie é utilizada no combate de sintomas de algumas patologias como febre, inflamação, reumatismo, dores de cabeça e no corpo. Logo, com o objetivo de aprofundar o conhecimento da espécie, este estudo visa avaliar as atividades antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva, bem como realizar o estudo toxicológico agudo da partição em diclorometano de *Siparuna guianensis*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo químico, toxicológico e farmacológico da partição em diclorometano das folhas de *Siparuna guianensis* (PDCM) visando agregar conhecimento ao estudo desta espécie.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar e identificar as classes químicas de substâncias presentes em PDCM;
- Determinar o teor de fenóis totais e flavonoides da PDCM.

Avaliar as seguintes atividades de PDCM:

In vitro

- Antioxidante pelos métodos do 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), fosfomolibidênio, β -caroteno/ácido linoleico e método do ácido tiobarbitúrico (TBA);

In vivo:

- Toxidez aguda;
- Anti-inflamatória, por meio do modelo de edema de orelha induzido pelo óleo de cróton e peritonite induzida por LPS;
- Antinociceptiva por meio dos modelos de contorção abdominal, teste da formalina e teste de retirada da cauda (*tail flick*);
- Locomotora.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 MATERIAL VEGETAL

As folhas de *S. guianensis* foram coletadas em Matias Barbosa, Minas Gerais, Brasil, em época de frutificação (dezembro de 2011) no período da manhã. Uma exsicata de *S. guianensis* foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESJ da UFJF sob o número 60333.

3.2 PREPARO DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DE *S. guianensis*

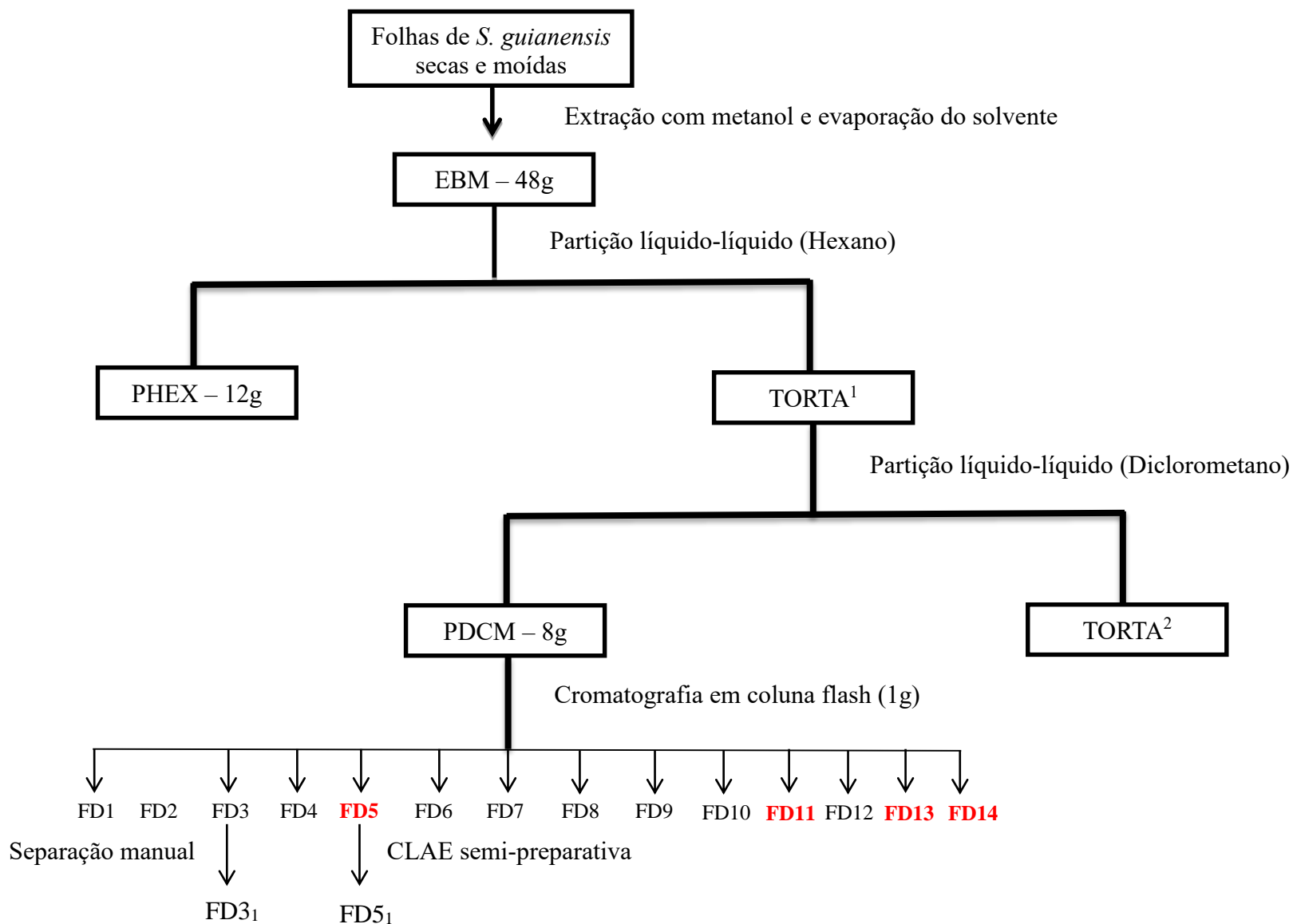
As folhas coletadas foram secas à sombra, em local ventilado e em temperatura ambiente. Depois de seco, o material (375 g) foi moído e submetido à extração por maceração estática com metanol (MeOH), até completa clarificação da solução. Em seguida, o extrato foi concentrado utilizando-se evaporador rotatório para obtenção do extrato bruto metanólico (EBM- 48 g). Após completa remoção do solvente, 48 g do EBM foram ressuspensos em MeOH: H₂O (8:2) e, em seguida, particionados com hexano, diclorometano e acetato de etila, obtendo as partições hexânica (PHEX - 12g), diclorometânica (PDCM – 8 g), acetato de etila (PACeT – 5g) e hidrometanólica (PHMe - 6g). As partições foram concentradas em evaporador rotatório e mantidas sob refrigeração. PDCM foi utilizada para caracterização química e ensaios farmacológicos enquanto que as demais amostras foram reservadas para futuros ensaios.

3.3 MÉTODOS CROMATOGRÁFICOS

3.3 1 Cromatografia Flash

Para o fracionamento da amostra foi utilizado um sistema de cromatografia flash (Sepacore BUCHI^R). Um grama da PDCM foi fracionado em coluna cromatográfica de vidro resistente à pressão, em sílica-gel (70 - 230 mesh), com gradiente crescente de eluição: hexano - acetato de etila (100% de hexano – 100% de acetato de etila) e acetato de etila – metanol (90:10 v/v – 100% de metanol), fluxo de 5 mL/min. Após fracionamento, as amostras foram concentradas à pressão reduzida, com auxílio do evaporador rotatório, analisadas, pesadas e agrupadas com base nos perfis obtidos por cromatografia em camada delgada (CCD).

Figura 3: Fluxograma com processo extrativo para obtenção da PDCM, seu fracionamento e isolamento dos constituintes FD3₁ e FD5₁. As amostras destacadas em vermelho referem-se às frações submetidas à CLAE para determinação dos perfis cromatográficos. TORTA 2*: Esta amostra foi particionada com acetato de etila, obtendo-se a partição em acetato de etila e um remanescente hidrometanólico que foram reservados para estudos posteriores.



3.3.2 Cromatografia em Camada Delgada

Para análise das amostras obtidas do fracionamento foram utilizadas cromatoplasmas revestidas de sílica gel sobre alumínio. Uma variedade de eluentes em diferentes polaridades e proporção foi empregada. A revelação das substâncias foi obtida por meio de revelador físico (luz ultravioleta – 254 e 365 nm) e/ou pela aspersão de reagentes químicos seguidos ou não de aquecimento em estufa a 100 °C por aproximadamente 5 minutos. Os reagentes utilizados foram solução de vanilina/ácido sulfúrico em etanol para identificação de terpenos, positivando em casos de manchas de coloração azul intenso e NP/PEG para flavonoides, positivando em casos de mancha amarela ou verde fluorescente. As frações semelhantes foram agrupadas e as com quantidade inferior a 50 mg não foram trabalhadas.

3.3.3 Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência foi realizada em um aparelho Agilent Technologies Série 1200, constituído de uma bomba quaternária, detector de arranjo de diodos - ultravioleta (DAD – UV) e injetor automático. As amostras foram solubilizadas nas fases móveis empregadas. Os solventes empregados apresentavam grau CLAE.

Perfil cromatográfico da PDCM e suas frações

A PDCM e as frações FD5, FD3₁, FD11, FD13 e FD14 foram analisadas por CLAE e as condições cromatográficas encontram-se na tabela 1.

Tabela 1: Condições cromatográficas utilizadas nas análises em CLAE.

<i>Amostra/ Concentração</i>	<i>Volume de injeção (μL)</i>	<i>Gradiente A /Proporção</i>	<i>Gradiente B/ Proporção</i>	<i>Tempo de eluição (min)</i>	<i>Fluxo (mL/min)</i>	<i>Tipo de coluna</i>
PDCM/ 1mg/mL	20	ACN/H ₂ O 5:95	ACN 100%	60	0,6	SB-C18
FD5 1mg/mL	20	ACN/H ₂ O 5:95	ACN 100%	30	0,8	SB-C18
FD3 ₁ 1mg/mL	20	ACN/H ₂ O 5:95	ACN 100%	30	0,8	SB-C18
FD11 1mg/mL	20	ACN/H ₂ O 5:95	ACN 100%	30	0,8	SB-C18
FD13 1mg/mL	20	MeOH/H ₂ O 5:95	MeOH 100%	30	0,8	SB-C18
FD14 1mg/mL	20	MeOH/H ₂ O 5:95	MeOH 100%	30	0,8	SB-C18

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

3.3.3.1 Isolamento de constituintes químicos de *S. guianensis*

De acordo com a complexidade dos cromatogramas obtidos em CLAE, optou-se pelas amostras FD5 e FD11 para realizar o isolamento de constituintes. O procedimento foi realizado em CLAE semipreparativa nas seguintes condições (tabela 2):

Tabela 2: Condições cromatográficas empregadas nas análises em CLAE semipreparativa

<i>Amostra/ concentração</i>	<i>Volume de injeção (μL) /n° de injeções</i>	<i>GradienteA /Proporção</i>	<i>GradienteB /Proporção</i>	<i>Tempo de eluição</i>	<i>Fluxo (ml/min)</i>	<i>Tipo de coluna</i>
FD5 (10mg/mL)	900/12	ACN/H ₂ O 95:5	ACN 100%	15 min	2,5	SB-C18 Semi- preparativa
FD11 (2,5mg/mL)	900/21	ACN/H ₂ O 95:5	ACN 100%	15 min	2,5	SB-C18 Semi- preparativa

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

3.4 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS

Para avaliação do teor de fenóis totais foi utilizado o método de Folin Ciocalteu (1927) com modificações. Em microplacas de 96 poços foram adicionados 30µL de amostra (500 µg/mL), 100 µL de solução de carbonato de sódio 4% e 120 µL de solução do reagente de Folin Ciocalteu 20%. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em leitor de microplacas a 760 nm. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. As medidas foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão de ácido tânico foi feita nas mesmas condições, com concentrações variando de 0,9 a 60 µg/mL. Para análise dos resultados foi usado Excel (regressão linear) e os mesmos foram expressos em mg/g de amostra em equivalente a ácido tânico (EAT).

3.5 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FLAVONOIDES

Para avaliação do teor de flavonoides foi utilizado o método de complexação com cloreto de alumínio com adaptações (DOWD, 1959). Em tubos de ensaio foram adicionados 250 µL das amostras, 250 µL de cloreto de alumínio 2%, 500 µL de etanol p.a. Os tubos foram mantidos em repouso ao abrigo da luz por 30 min. Uma alíquota de 250 µL foi transferida para placa de 96 poços e a absorbância medida em leitor de microplacas a 415 nm. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. As medidas foram realizadas em triplicata. Uma curva padrão de quercetina foi feita nas mesmas condições, com concentrações variando de 0,25 a 40 µg/mL. Para análise dos resultados foi usado Excel (regressão linear) e os mesmos foram expressos em mg/g de amostra em equivalente à quercetina (EQ).

3.6 ATIVIDADES *IN VITRO*

3.6.1 Atividade antioxidante

3.6.1.1 Método de sequestro de radicais livres – DPPH

A atividade antioxidante neste ensaio foi mensurada pela capacidade da amostra em sequestrar o DPPH (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BERSET, 1997). PDCM, e os controles positivos (quercetina e ácido ascórbico), foram solubilizados em MeOH (1 mg/mL). 100 μ L dessas soluções foram transferidos para uma placa de 96 poços e 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol foram realizadas, obtendo-se as seguintes concentrações: 250; 125; 62,5; 31,25; 15,63; 7,81; 3,91, 1,95 e 0,98 μ g/mL. Em seguida, 150 μ L de uma solução de DPPH (20 μ g/mL) em metanol foi adicionada a estes poços. Decorridos 30 min de incubação ao abrigo da luz, a absorbância foi medida em 517 nm em leitor de microplacas. Poços somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste, as medidas foram realizadas em triplicata.

Os resultados foram expressos em concentração inibitória média (CI_{50}), que é a concentração de amostra requerida para decrescer a concentração do radical DPPH em 50%. O cálculo foi realizado com auxílio do software GraFit 7.

3.6.1.2 Método do fosfomolibdênio

Segundo Prieto, Pineda e Aguilar (1999) este ensaio é capaz de determinar a capacidade antioxidante total (CAT) de uma amostra. Inicialmente foi preparada uma solução constituída de fosfato de sódio (Na_3PO_4) (28 mL, 0,1 mol/L), molibdato de amônio ($[(NH_4)_6Mo_7O_{24}.4H_2O]$) (12 mL, 0,03 mol/L) e ácido sulfúrico (H_2SO_4) (20 mL, 3 mol/L) em meio aquoso, volume final ajustado com água destilada para 100 mL, afim de garantir a formação do complexo de fosfomolibdênio. A seguir, em tubos de ensaio, 2 mL da solução reagente e 300 μ L da PDCM e a substância de referência (ácido ascórbico) na concentração de 200 μ g/mL em metanol são adicionados. Os mesmos foram fechados e mantidos em estufa a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, uma alíquota de 200 μ L foi transferida para placa de 96 poços procedendo-se à leitura a 695 nm em leitor de microplacas. O ensaio foi realizado em triplicata. Para a avaliação dos resultados, foi feita uma curva padrão com diferentes concentrações de ácido ascórbico, entre 25 μ g/mL e 500 μ g/mL. A CAT foi calculada em função da curva padrão e expressa em equivalente à ácido ascórbico \pm desvio padrão.

3.6.1.3 Descoramento pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante neste método diz respeito a capacidade de substâncias inibirem a peroxidação do ácido linoleico, desta forma como substrato foi utilizada uma emulsão de β -caroteno e ácido linoleico (MARCO, 1968). O preparo da mesma sucedeu-se adicionando a um balão de fundo redondo, 30 μ L de ácido linoleico, 265 μ L de Tween 40, 50 μ l de uma solução de β -caroteno (10 mg/mL) e 500 μ L de diclorometano. Após, o diclorometano foi removido com auxílio de nitrogênio gasoso, e cerca de 40 mL de água previamente saturada com oxigênio foram adicionados. A absorbância da emulsão foi ajustada entre 0,6 e 0,7 nm e em microplacas de 96 poços foram adicionados 250 μ L da emulsão e 20 μ L da amostra em 6 concentrações, variando de 222 a 18,5 μ g/mL em metanol. O ensaio foi realizado em triplicata. Quercetina foi utilizada como substância referência e a emulsão como controle negativo (100% de oxidação). As leituras procederam de forma sequencial durante 120 min, com intervalos de 15 min a 45°C e em 470 nm. O decaimento da absorbância das amostras (Am) pode ser correlacionado com o decaimento da absorbância do controle (Ac), obtendo-se a porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno (%I) por meio da seguinte fórmula:

$$\%I = \frac{(Ac - Am)}{Ac} \times 100$$

Em que:

Ac = Abs inicial (T₀) – Abs final (T₉)

Am = Abs inicial (T₀) – Abs final (T₉)

3.6.1.4 Peroxidação lipídica utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA)

Proposto por Wong e colaboradores (1995), este ensaio utiliza a carne moída como substrato propício à formação de um ambiente oxidativo. Amostras constituídas de 25 g de carne moída, 17 mL de água e 7,5; 15 e 30 mg de PDCM ou BHT (substância referência), respectivamente, foram preparadas. O controle negativo foi preparado somente com carne moída e água. Após, foram misturados com um auxílio de um mixer e levados ao aquecimento para cozimento da carne. Em seguida, o preparo do homogenato foi finalizado completando-se um volume de 100 mL com água destilada. Os mesmos foram acondicionados em frasco âmbar sob refrigeração no decorrer do experimento. Nos 4 dias subsequentes, 0,5g de homogenato foram transferidos para tubos de ensaio

juntamente com 50 µL de solução etanólica de BHT 4%, 2,5 mL de ácido fosfórico 1% e 1,25 mL de ácido tiobarbitúrico 1% (em NaOH 0,05 M). Estas soluções foram aquecidas em banho fervente durante 15 minutos e, em seguida, resfriadas em banho de gelo por 10 min. Após resfriamento, foram adicionados 3 mL de butanol em cada tubo de ensaio e estes centrifugados por 4000 g por 5 min para separação da fase orgânica. Por fim, 200 µL do sobrenadante foram transferidos para microplacas e suas respectivas absorbâncias lidas em leitor de microplacas a 535 nm. Uma curva padrão de malonaldeído (MDA) foi feita sob as mesmas condições a partir da hidrólise do tetrametoxipropano, com concentrações variando de 0,15 a 5 µM. Para análise dos resultados foi usado Excel (regressão linear) e análise de variância (ANOVA) seguido por Bonferroni, sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico GraphPad Prism 5.0.

3.7 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO*

3.7.1 Animais

Foram utilizados camundongos machos Swiss (*Mus musculus*), provenientes do Centro de Biologia da Reprodução (CBR) da Universidade Federal de Juiz de Fora, pesando entre 25 e 35 g. Estes foram alojados em gaiolas e mantidos em condições controladas de temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo de claro/escuro de 12h), com água e ração comercial (Nuvital TM) *ad libitum*. Para realização dos testes, os animais foram deixados em jejum por um período de 12 h, com livre acesso à água. Antes dos ensaios, os animais passaram por um período de adaptação de, no mínimo, 72h. Os grupos foram constituídos de 5-8 animais. Todos os protocolos experimentais e procedimentos estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foram aprovados pela Comissão de Ética na Experimentação Animal (protocolos 021/2012, 096/2012, 013/2013, 016/2013, 042/2015 da CEEA) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFJF.

3.7.2 Teste toxicológico agudo

Os animais foram tratados v.o. com auxílio de uma cânula para gavagem com salina contendo 12% de Tween 80 (v/v) (veículo) ou com PDCM nas doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg. O volume de todas as soluções administradas por via oral foi de 10 mL/kg. Os animais receberam doses crescentes da PDCM ou controle com o objetivo de determinar o valor da dose letal média (DL₅₀). Após 12 h de jejum, os animais receberam a PDCM em uma dose única. Após receberem a PDCM ou o controle, os

animais foram observados durante as primeiras 24 h, nos períodos de 0, 15, 30 e 60min e a cada 4h e diariamente durante 14 dias após administração, permitindo verificar os efeitos tardios do tratamento. Os parâmetros observados como sinais tóxicos de caráter geral foram: alteração da locomoção total, comportamento, respiração, piloereção, diarreia, convulsões, contorções abdominais, alteração dos tônus muscular, agressividade e possíveis mortes. Também, da 24^a h até 14 dias, foram observados a variação de peso, consumo de alimentos e água. Ao final dos 15 dias, os animais foram sacrificados e os órgãos vitais (rins direito e esquerdo, fígado, coração, pulmões) analisados quanto às anormalidades macroscópicas, retirados e pesados para obter o peso absoluto de cada um (COSTA-SILVA, 2004).

O peso relativo dos órgãos foi calculado relacionando seu peso com o peso corporal do animal correspondente, segundo a equação:

$$\text{Peso relativo do órgão} = \left(\frac{\text{peso do órgão}}{\text{peso corporal}} \right) \times 100$$

3.7.3 Atividade anti-inflamatória

3.7.3.1 Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

A atividade anti-inflamatória foi avaliada pelo método do edema de orelha descrito por Schiantarelli e colaboradores (1982). Os animais foram previamente tratados com PDCM nas concentrações de 100, 200 e 300 mg/kg, indometacina 10 mg/kg e 12% Tween em salina (veículo) foram utilizados como controle positivo e controle negativo, respectivamente. Todas as soluções foram administradas v.o. com auxílio de uma cânula para gavagem no volume de 10 mL/kg. Decorridos 60 min do tratamento, foram aplicados topicamente 20 µL de uma solução fresca de óleo de cróton 2,5 % (v/v) no pavilhão auricular direito e o mesmo volume de acetona no pavilhão auricular esquerdo de cada animal (figura 4). Seis horas após o início do experimento, os animais foram sacrificados e, com o auxílio de um punch metálico, discos idênticos de 6 mm de diâmetro foram obtidos de ambas as orelhas de cada animal. Os discos foram pesados em balança analítica e a diferença de peso entre eles indicou a intensidade do edema. Os resultados foram representados como média ± e.p.m das diferenças de peso dentro de cada grupo.

Figura 4: Orelha direita (indicada pela seta em preto) após aplicação do agente flogístico.



Fonte: ACERVO PESSOAL

3.7.3.2 Modelo de peritonite induzida por LPS

O modelo de peritonite aguda foi estabelecido de acordo com descrito por Borges e colaboradores (2014) com pequenas modificações. Os animais (n 6-8) foram previamente tratados com PDMC nas concentrações de 50 e 100 mg/Kg, dexametasona (1mg/kg – grupo controle positivo) e 12% Tween em salina (grupo controle negativo). Todas as soluções foram administradas v.o. com auxílio de uma cânula para gavagem no volume de 10 mL/kg. Decorridos 60 min do tratamento, o processo inflamatório foi induzido por meio da injeção intraperitoneal de 200 μ L de lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli* O111: B4 (25 μ g/mL) ou solução salina estéril 0,9% (grupo NAIVE). Quatro horas após a indução, os animais foram eutanasiados e a cavidade abdominal exposta. Com o auxílio de uma seringa, 4 mL de tampão fosfato salina contendo 0,5% de citrato de sódio foram injetados através do peritônio e após massagem suave da cavidade, a suspensão celular foi aspirada e transferida para tubo contendo EDTA. Alíquotas do fluido peritonial foram imediatamente transferidas para tubos de ensaio contendo líquido de Turke para contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

3.7.4 Atividade antinociceptiva

3.7.4.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético

Para a execução do ensaio todas as soluções foram preparadas em salina com 12% de Tween 80 (v/v) e administradas via oral (v.o.) no volume de 10 mL/kg com auxílio de uma cânula para gavagem. Os animais foram tratados com o veículo (controle

negativo), indometacina-10 mg/kg- (controle positivo) e PDCM 100, 200 e 300 mg/kg (grupos teste). Após 1 h, os animais receberam ácido acético (0,6% em salina) 0,1 mL/10g, por via intraperitoneal (i.p.). As contorções da parede abdominal, seguidas de torções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas (figura 5), foram contadas durante 30 minutos como indicativo de nocicepção. Os resultados foram expressos como média do número acumulado de contorções (KOSTER et al., 1959).

Figura 5: Manifestação comportamental característica da administração de ácido acético i.p.



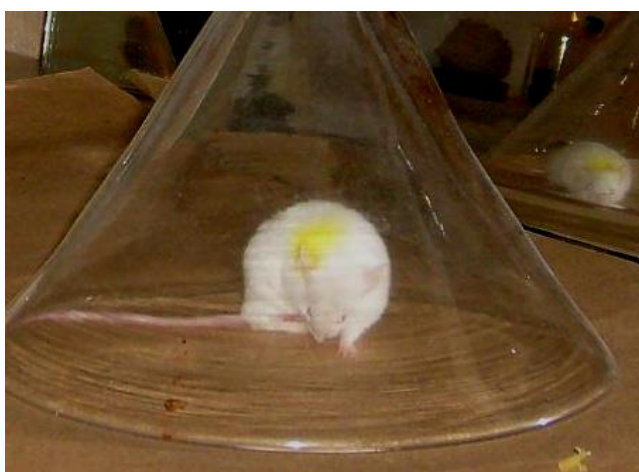
Fonte: ACERVO PESSOAL

3.7.4.2 Teste da formalina

O procedimento usado para a indução de nocicepção de mediação central e periférica foi uma adaptação do método de Hunskaar e colaboradores (1985). Os animais foram tratados v.o. com auxílio de uma cânula para gavagem com salina contendo 12% de Tween 80 (v/v) (veículo), indometacina 10 mg/kg (controle positivo) ou com PDCM nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg (grupos teste). O volume de todas as soluções administradas v.o. foi de 10 mL/kg. Uma solução de morfina 7,5 mg/kg diluída em salina (controle positivo) também foi administrada no volume de 10 mL/kg, porém via intraperitoneal e 30 min antes do experimento. Durante 30 ou 60 min após os tratamentos foram aplicados 20 μ L de uma injeção subcutânea subplantar (s.pl.) de formalina (solução de formol a 2% em salina estéril) na pata posterior direita do animal. Após a injeção, os animais foram colocados individualmente dentro de um funil de vidro invertido, com o auxílio de um espelho

para facilitar a observação, e em seguida, o tempo de lambida da pata direita foi cronometrado durante 30 min. O tempo que os animais permaneceram lambendo as patas (*licking-time*), durante este período, foi quantificado cumulativamente em segundos como índice de nocicepção (figura 6). Os primeiros 5 min determinam resposta à nocicepção de origem neurogênica (1° fase), dos 15-30 min (2° fase), tem-se uma resposta tônica à nocicepção, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios.

Figura 6: Lambedura da pata direita devido a administração s.pl. de formalina



Fonte: ACERVO PESSOAL

3.7.4.3 Teste da retirada da cauda (*Tail-Flick*)

Descrito previamente por D'Amour e Smith (1941), neste ensaio os animais foram imobilizados no interior de um pequeno cilindro de plástico rígido e com ventilação, de tal forma que a cauda permanecesse para o lado de fora do tubo. O terço medial da cauda foi imerso em banho-maria (55 ± 1 °C) (figura 7) e verificou-se o tempo de permanência da cauda na água, que não deve ser superior a 15s para minimizar os danos tissulares. Posterior à obtenção de dois valores basais (reação normal do animal ao estímulo térmico), com intervalos de 20 min, os camundongos foram tratados via oral com auxílio de uma cânula para gavagem com veículo (salina com 12% de Tween 80 v/v) ou com PDCM nas doses de 100, 200 ou 300 mg/kg no volume de 10 mL/kg. Uma solução de morfina 7,5 mg/kg diluída em salina (controle positivo) também foi administrada, porém via intraperitoneal 10 mL/kg. Após 1 h dos tratamentos via oral e 30 min da administração de morfina, a resposta foi novamente avaliada, tempo

1. Os tempos 2 e 3 foram avaliados após 1h:30 min dos tratamentos v.o., 1h da morfina i.p. e 2h dos tratamentos v.o., 1h:30 min da morfina i.p., respectivamente. O efeito antinociceptivo foi calculado por meio da diferença entre tempos basais e nos momentos 1, 2 e 3.

Figura 7: Imersão da cauda em banho-maria para execução do teste.



Fonte: ACERVO PESSOAL

3.7.5 Avaliação da atividade locomotora (*open-field*)

O teste *open-field* foi realizado visando determinar possível ação central sedativa ou periférica ao nível da junção neuromuscular, o que poderia levar a resultados falso-positivos para modelos de nocicepção que são fundamentalmente comportamentais. O aparato é uma caixa medindo 40 cm em todos os lados, sem parte superior. Seu piso é constituído de 9 quadrantes de mesmo tamanho, sendo uma das paredes laterais constituídas de vidro, para facilitar a observação frontal dos animais (figura 8). Assim, são avaliados dois parâmetros durante 5 min, o número de Crossings e o número de “rearings”. O primeiro consiste no número de vezes que o animal cruza de um quadrante para o outro, enquanto que o segundo diz respeito ao ato de explorar o ambiente, levantando o corpo sob as patas traseiras (ARCHER, 1973). Os animais foram pré-tratados, v.o., com PDCM 100 mg/kg ou salina (controle negativo), 1 h antes do teste. Individualmente, foram colocados na caixa e observados por 5 min.

Figura 8: Imagem demonstrativa do aparato utilizado no experimento *open-field*



Fonte: SERVAT, 2012

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos ensaios que foram empregadas análises estatísticas, os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m.) avaliados pela análise de variância (ANOVA) e comparados pelos testes de Bonferroni, Dunnet, Newman-Keuls ou Teste t de Student sendo os cálculos realizados a partir do Software estatístico GraphPad Prism 7.0. Valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$), comparados ao controle negativo foram considerados significativos.

Para o cálculo das percentagens de inibição nos testes antioxidantes antinociceptivos e anti-inflamatórios foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Percentagem de inibição (\%)} = \frac{V_c - V_t}{V_c} \times 100$$

Em que:

V_t e V_c , representam a média das absorbâncias e concentrações do complexo TBA-MDA, no caso dos ensaios antioxidantes, das percentagens de viabilidade celular ou concentração de óxido nítrico, no caso dos ensaios em cultura de células, peso das orelhas ou média do número de contorções ou média do tempo de lambida da pata ou média do tempo de permanência da cauda na água ou a média de leucócitos contados na câmara de Neubauer dos tratamentos e controle, respectivamente, no caso dos ensaios *in vivo*.

4 RESULTADOS

4.1 FRACIONAMENTO DE PDCM

O fracionamento da partição em diclorometano por cromatografia flash foi executado com o intuito de se obter amostras semi-purificadas para posterior isolamento e identificação de metabólitos especiais da espécie. Este processo deu origem, inicialmente, a 36 frações que após agrupamento de acordo como perfil cromatográfico apresentado por CCD resultou em 14 amostras (FD1 a FD14). O rendimento obtido foi de 76,3%. Durante esse processo, houve a formação de um sólido branco amorfo na fração FD3 (FD3₁ – 7 mg) que foi devidamente separado (tabela 3).

Tabela 3: Amostras provenientes do fracionamento da PDMC por cromatografia flash com os respectivos sistemas de eluição, massa e rendimento.

<i>Amostra</i>	<i>Eluentes</i>	<i>Peso (mg)</i>	<i>%</i>	<i>Observações</i>
FD1	Hex/AcEt 80:20	20,0	2	
FD2	Hex/AcEt 90:10	34,4	3,44	
FD3	AcEt 100	30,0	3	FD3 ₁ – 7 mg (0,7 %)
FD4	AcEt 100	25,1	2,51	
FD5	AcEt 100	77,0	7,7	
FD6	AcEt 100	31,8	3,18	
FD7	AcEt 100	22,2	2,22	
FD8	AcEt 100	25,8	2,58	
FD9	AcEt 100	12,1	1,21	
FD10	AcEt 100	35,5	3,55	
FD11	AcEt:MeOH 80:20	69,1	6,91	
FD12	AcEt:MeOH 80:20	28,5	2,85	
FD13	AcEt:MeOH 80:20	126,3	12,63	
FD14	AcEt:MeOH 80:20	218,2	21,82	

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

Após revelação das placas com reveladores específicos, foi possível identificar a presença de constituintes terpênicos e flavonoides em PDCM. Cinco frações (FD2, FD3, FD3₁, FD4 e FD5) apresentaram bandas azuis características de compostos terpênicos após aspersão do reagente químico vanilina/ácido sulfúrico. Outras 6 frações (FD1, FD2, FD10, FD11, FD13 e FD14), após aspersão do reagente NP/PEG, apresentaram bandas amarelas fluorescentes quando visualizadas em luz ultravioleta com comprimento de onda de 365 nm, sugerindo a presença de flavonoides.

As amostras que apresentaram compostos terpênicos e flavonoides, e que possuíam massa maior que 50 mg, foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência, juntamente com a PDCM.

4.2 PERFIL CROMATOGRÁFICO DA PDCM E SUAS FRAÇÕES

O perfil cromatográfico da PDCM, observado por CLAE indicou a presença de uma série de substâncias com tempo de retenção (TR) variando entre 2 e 54 min, atentando-se para a presença de três substâncias (A, B e C) com TR igual a 22,7; 23,5 e 30,5 min, respectivamente (figura 9).

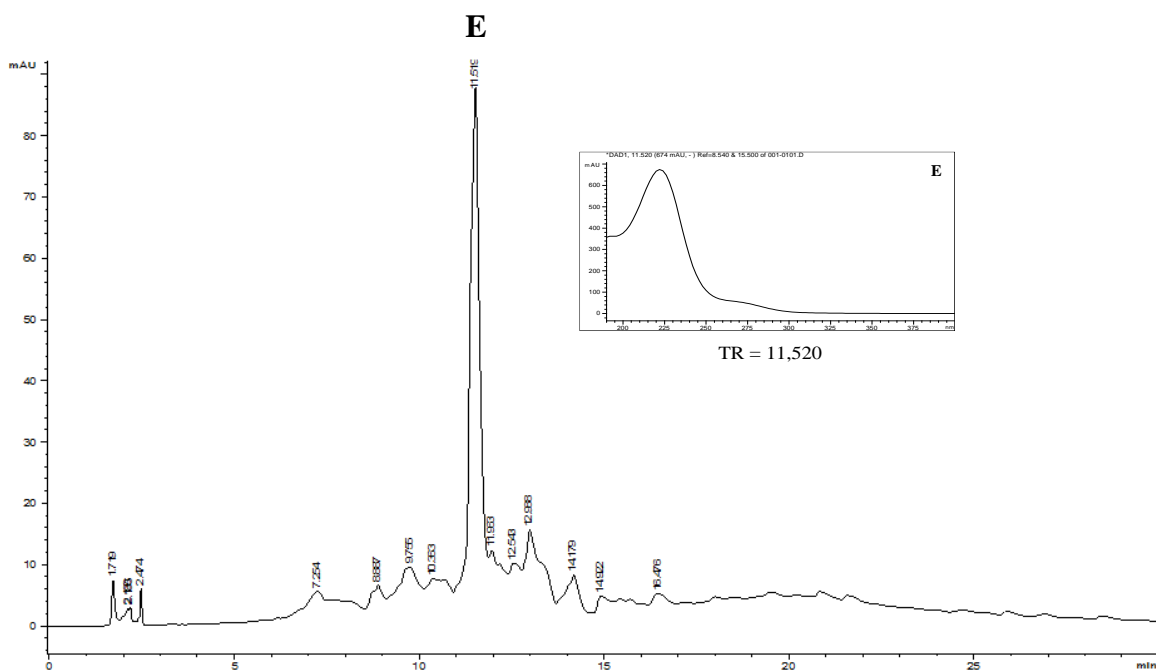
As frações de PDMC (FD3₁, FD5, FD11, FD13 e FD14), também foram analisadas por CLAE. A amostra FD3₁, referente ao precipitado sólido separado a partir da fração FD3, se mostrou com grau de pureza de 96,75% na detecção em 245 nm (figura 10).

Para a fração FD5 foram observadas substâncias entre os tempos de 1 e 17 min. No entanto, devido à facilidade de separação da substância E (figura 11) a mesma foi submetida a CLAE semipreparativa.

Assim como a FD5, a amostra FD11 apresentou perfil cromatográfico satisfatório possibilitando o isolamento da substância F (figura 12) em CLAE semipreparativa.

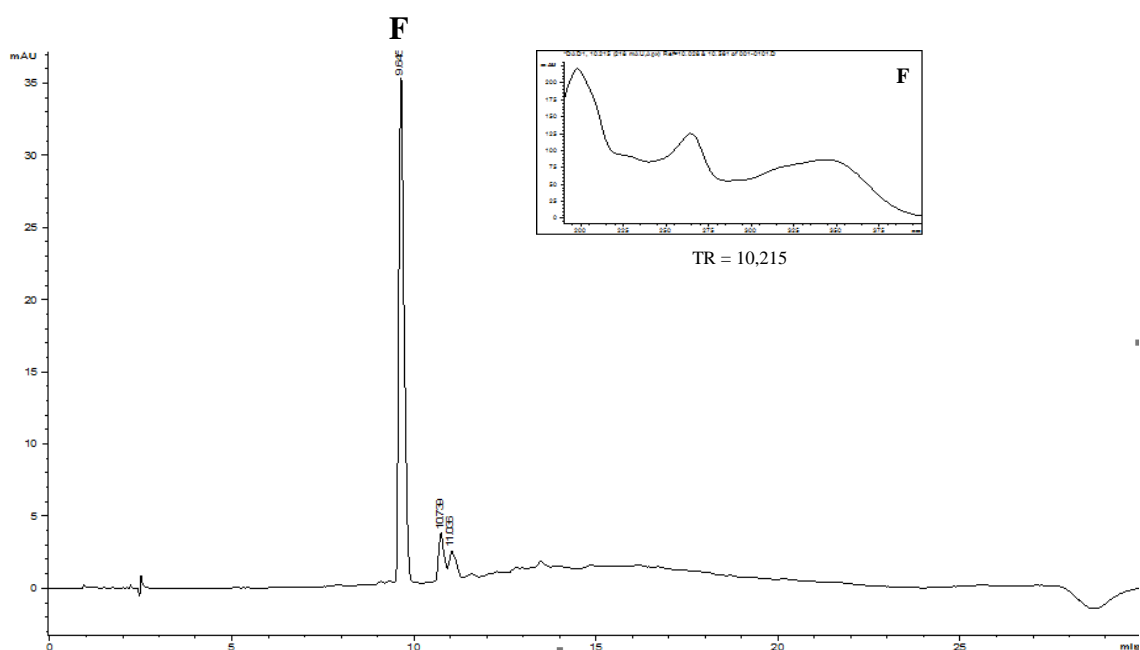
Em contrapartida, as amostras FD13 e FD14 apresentaram perfil cromatográfico complexo, não sendo efetuada nesse momento a separação dos constituintes G, H e I (TR = 17,9; 18,3, e 18,7 min respectivamente), no caso de FD13 (Figura 13) e J, K e L (TR = 17,8, 18,2 e 18,7 min respectivamente), no caso de FD14 (Figura 14) por CLAE.

Figura 11: Perfil cromatográfico da amostra FD5, proveniente da PDCM.



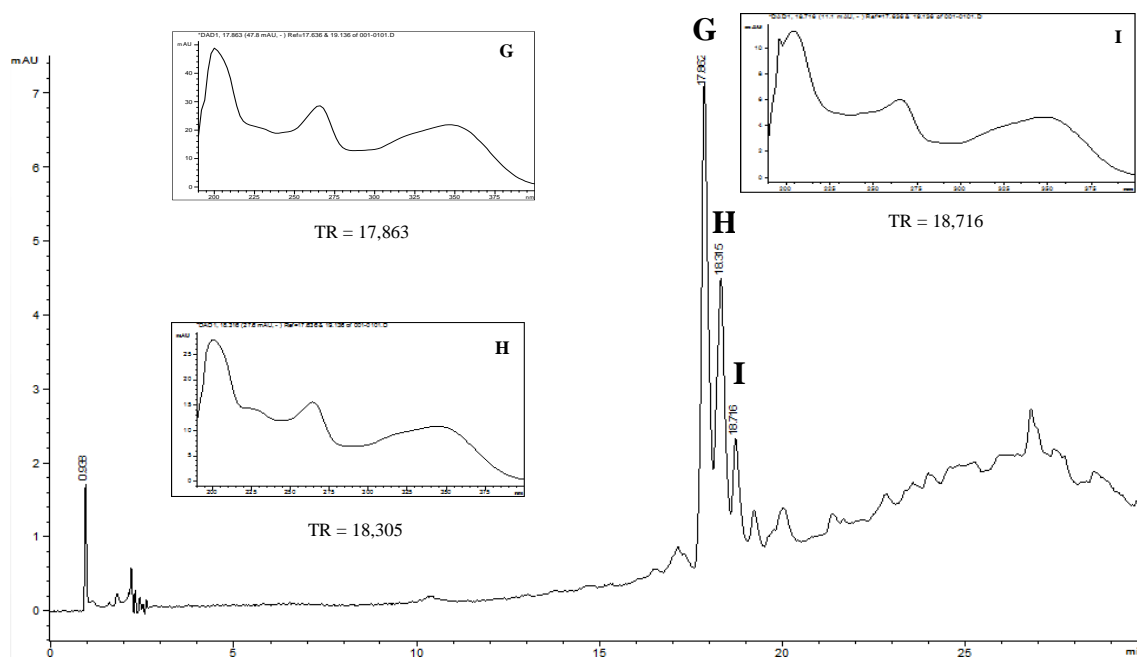
Condições do HPLC: SB-18; gradiente linear de solventes A (acetonitrila:água, 5:95; v/v) e B (acetonitrila 100%) variando de 0 a 100% de B em 30 min 0,8 mL/min; volume de injeção, 20 μ L; detecção no UV, 254 nm.

Figura 12: Perfil cromatográfico da amostra FD11, proveniente da PDCM.



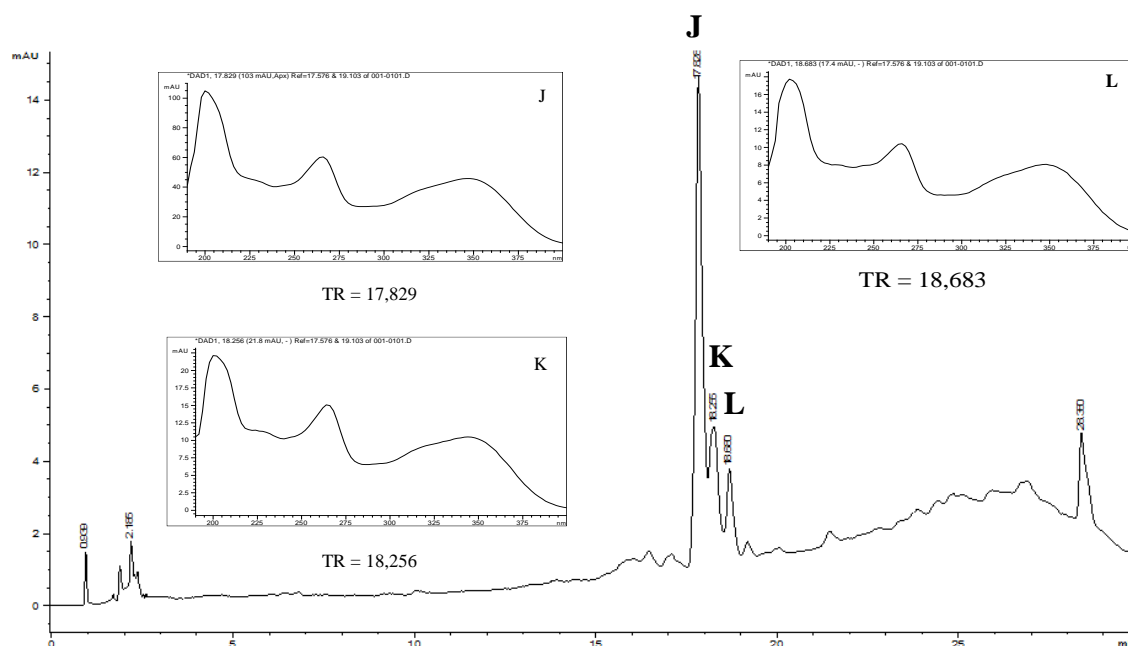
Condições do HPLC: SB-18; gradiente linear de solventes A (acetonitrila:água, 5:95; v/v) e B (acetonitrila 100%) variando de 0 a 100% de B em 30 min 0,8 mL/min; volume de injeção, 20 μ L; detecção no UV, 330 nm.

Figura 13: Perfil cromatográfico da amostra FD13, proveniente da PDCM.



Condições do HPLC: SB-18; gradiente linear de solventes A (metanol:água, 5:95; v/v) e B (metanol 100%) variando de 0 a 100% de B em 30 min 0,8 mL/min; volume de injeção, 20 μ L; detecção no UV, 330 nm.

Figura 14: Perfil cromatográfico da amostra FD14, proveniente da PDCM.



Condições do HPLC: SB-18; gradiente linear de solventes A (metanol:água, 5:95; v/v) e B (metanol 100%) variando de 0 a 100% de B em 30 min 0,8 mL/min; volume de injeção, 20 μ L; detecção no UV, 330 nm.

Os espectros UV de varredura das substâncias de interesse foram obtidos na faixa de 200 a 400 nm. As substâncias A, B (presentes na PDCM), F (presente em FD11), G, H, I (presentes em FD13), J, K e L (presentes em FD14) apresentaram espectros no UV muito semelhantes, com picos de absorção em λ 200, 265 e 350 nm. As substâncias D (FD3₁) e E (FD5), por sua vez, apresentaram bandas no espectro de ultravioleta com máximos de absorção em aproximadamente 225 nm.

4.3 TEOR DE SUBSTÂNCIAS FENÓLICAS E FLAVONOIDES

Os teores de fenóis e flavonoides de PDCM estão apresentados na tabela 4. Os mesmos foram expressos com média \pm erro padrão da média (e.p.m.) em equivalentes de ácido tânico, no caso do teor de fenólicos, e em equivalentes em quercetina, no caso do teor de flavonoides.

Tabela 4: Teor de fenóis e flavonoides na PDCM.

<i>Amostra</i>	<i>EAT</i> ($\mu\text{g fenólicos/mg amostra}$)	<i>EQ</i> ($\mu\text{g flavonoides/mg amostra}$)
PDCM	84,86 \pm 4,69	57,16 \pm 3,63

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

4.4 ATIVIDADES *IN VITRO*

4.4.1 Atividade antioxidante

4.4.1.1 Método DPPH, fosfomolibidênio e sistema β -caroteno / ácido linoleico

O potencial antioxidante de PDCM frente ao radical DPPH, ao método do fosfomolibidênio e empregando o sistema β -caroteno / ácido linoleico estão apresentados na tabela 5. Os resultados foram expressos como média \pm e.p.m.

Tabela 5: Atividade antioxidante de PDCM por meio dos métodos de redução do radical DPPH, fosfomolibidênio e descoloramento do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores estão representados como média \pm e.p.m. de CI₅₀, CAA ou percentual de inibição. NR – Resultados não representativos.

<i>Método</i>	<i>CAT</i> (EAA)	<i>DPPH</i> (CI ₅₀) $\mu\text{g/mL}$	<i>Sistema β-caroteno/ácido Linoleico</i> (% inibição)				
			222 $\mu\text{g/mL}$	148 $\mu\text{g/mL}$	74 $\mu\text{g/mL}$	37 $\mu\text{g/mL}$	18,5 $\mu\text{g/mL}$
<i>Amostra</i>							
<i>PDCM</i>	0,35 \pm 0,05	25,12 \pm 2,19	63,54 \pm 2,84	53,50 \pm 5,11	40,92 \pm 0,78	21,73 \pm 2,42	16,44 \pm 0,86
<i>AA</i>	NR	0,23 \pm 0,02	NR	NR	NR	NR	NR
<i>Q</i>	NR	1,31 \pm 0,14	83,63 \pm 6,86	87,20 \pm 1,07	86,09 \pm 1,24	71,28 \pm 3,42	71,21 \pm 4,03

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

4.4.1.2 Peroxidação lipídica utilizando o ácido tiobarbitúrico (TBA)

Os resultados antioxidantes da PDCM e controles frente a peroxidação lipídica encontram-se na figura 15 e tabela 6. É possível observar, na figura 17, que na concentração de 7,5 mg a amostra foi capaz de inibir a peroxidação de maneira estatisticamente igual à substância referência, BHT, na mesma concentração. Este comportamento se estendeu até o final do experimento. As demais concentrações (15 e 30 mg) também inibiram o processo de peroxidação, porém de maneira menos eficaz que a PDCM 7,5 e o BHT nas respectivas concentrações.

Figura 15: Efeito antioxidante da PDCM em modelo de peroxidação lipídica. Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. das concentrações (μM) do complexo TBA-MDA. ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni foram utilizados como teste post-hoc. Valores significativos: $p^* < 0,001$ vs controle; # estatisticamente igual ao BHT 7,5.

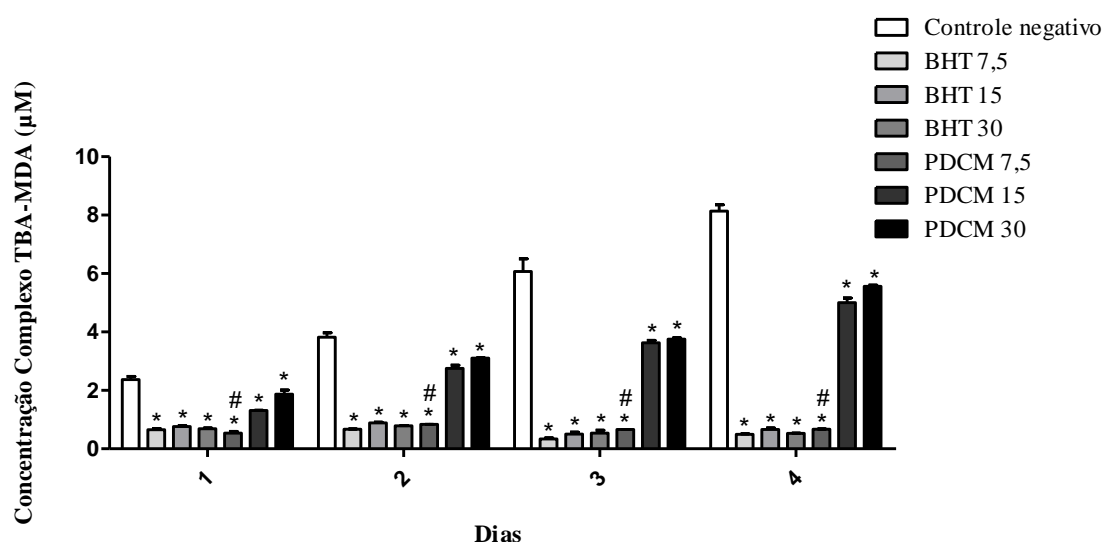


Tabela 6: Percentual de Inibição (% I) da amostra (PDCM) e BHT para o método do TBA, em relação ao controle negativo.

<i>Dias</i>	<i>Amostras - % I</i>					
	BHT 7,5	BHT 15	BHT 30	PDCM 7,5	PDCM 15	PDCM 30
<i>1</i>	43,62± 0,81	41,36± 0,93	42,73± 0,52	46,57± 1,36	26,89± 0,25	12,82± 3,56
<i>2</i>	58,42± 0,16	54,55± 0,58	56,30± 0,08	55,51± 0,06	19,89± 2,97	13,41± 0,16
<i>3</i>	75,06± 0,1	72,86± 1,03	72,48± 0,55	70,90± 0,38	31,91± 0,86	30,28± 1,29
<i>4</i>	78,76± 0,20	76,80± 0,38	78,42± 1,28	76,95± 0,10	32,29± 1,62	26,58± 0,44

Fonte: ELABORADO PELO PRÓPRIO AUTOR (2017)

4.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS *IN VIVO*

4.5.1 Teste toxicológico agudo

Durante os 14 dias de experimento não foram observados sinais de toxidez aguda ou morte em nenhum dos animais tratados com a PDCM, em quaisquer doses. Uma autópsia foi realizada ao final do experimento não revelando nenhuma alteração macroscópica dos órgãos.

Quanto à massa relativa dos órgãos e consumo de água, não foram observadas diferenças estatísticas entre os animais tratados com a PDCM (em todas as doses) e o grupo controle (figura 16 e 17).

Figura 16: Efeito da PDCM de *S. guianensis* sobre a massa relativa dos órgãos dos camundongos ao fim dos 14 dias de experimento. Controle (veículo) e PDCM (Doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg). Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. massa relativa dos órgãos em g/kg. ANOVA, seguida por Bonferroni.

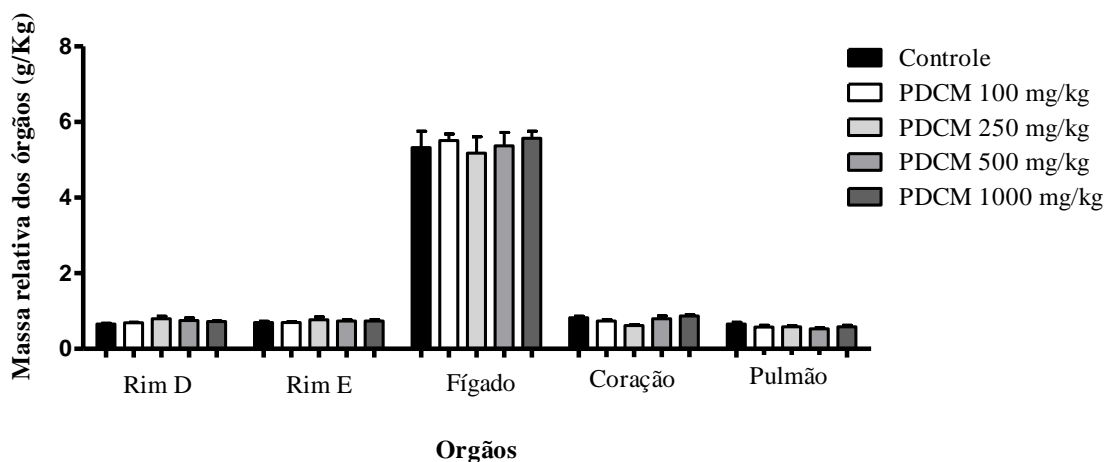
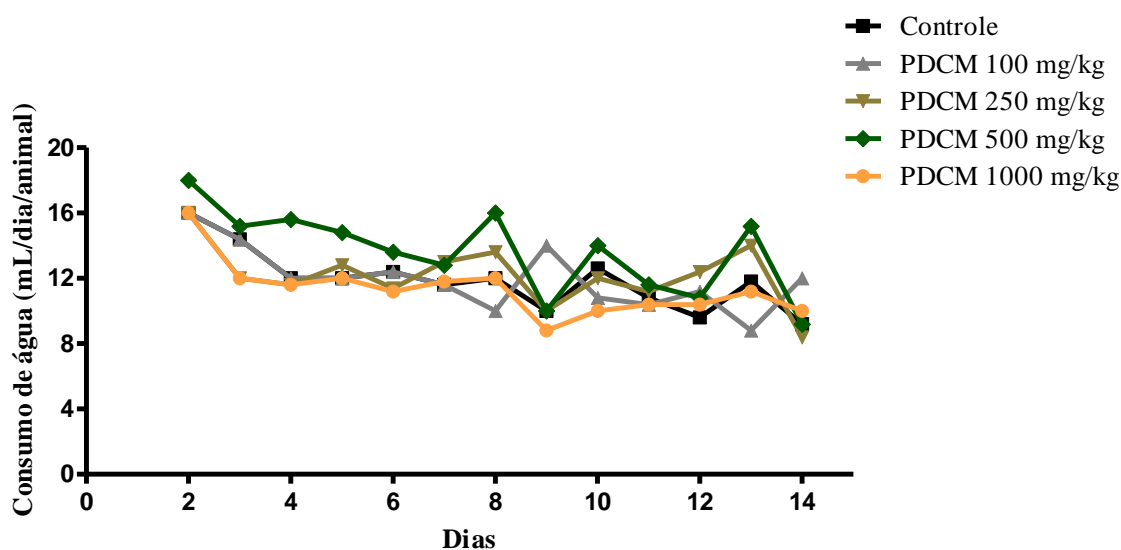
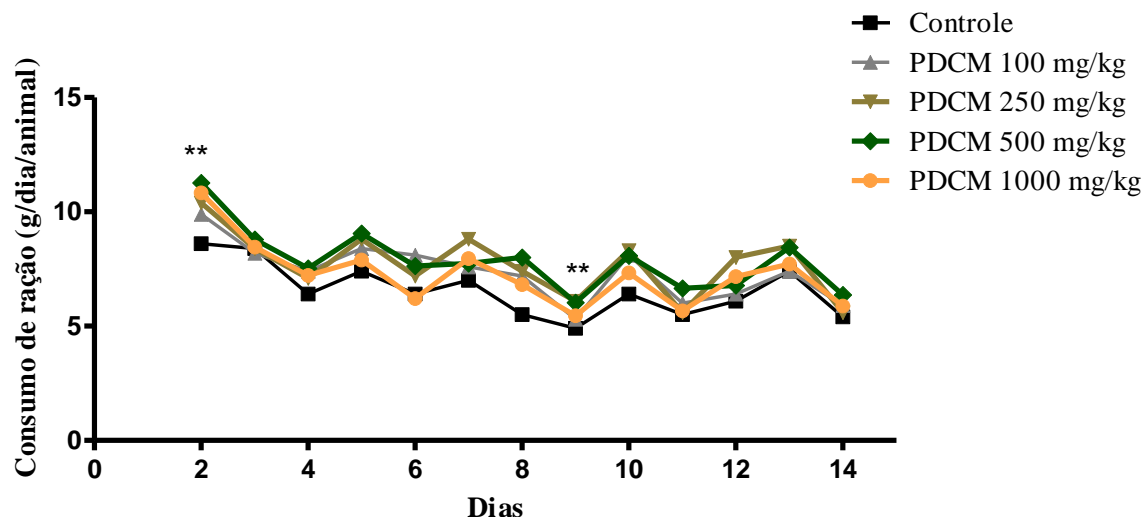


Figura 17: Efeito da PDCM de *S. guianensis* sobre o consumo de água dos camundongos durante 14 dias. Controle (veículo) e PDCM (Doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg). Os valores em cada coluna representam a média do consumo de água em mL/dia/animal. ANOVA, seguida por Bonferroni.



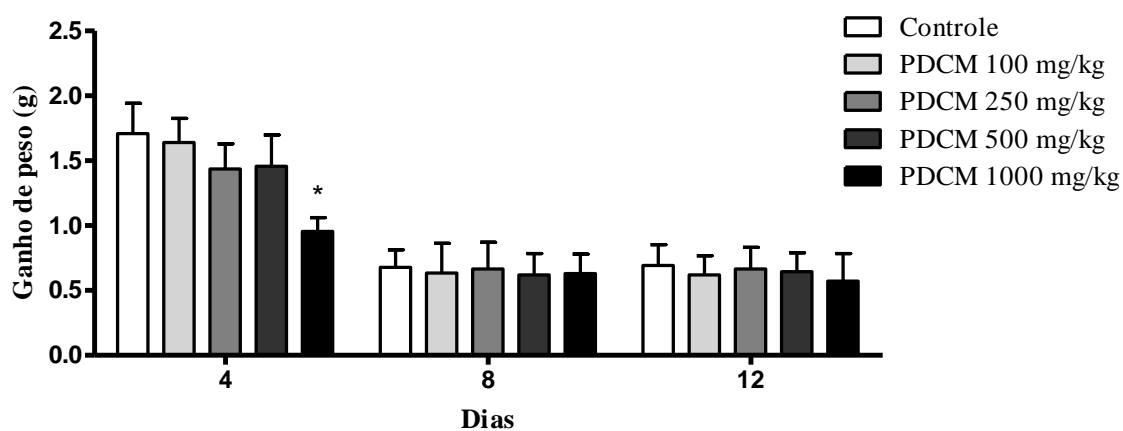
Em contrapartida, diferenças significativas foram observadas com relação ao consumo de ração dos animais tratados com a PDCM na dose de 500 mg/kg em dois momentos no decorrer do experimento (figura 18). No 2º dia os animais apresentaram um aumento padrão de consumo de ração e no 9º dia esse consumo foi menor quando comparado ao grupo controle.

Figura 18: Efeito da PDCM de *S. guianensis* sobre o consumo de ração dos camundongos durante 14 dias. Controle (veículo) e PDCM (Doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg) Os valores em cada coluna representam a média do consumo de ração em g/dia/animal. ANOVA, seguida por Bonferroni. Valores significativos: $p^{**}<0,01$ vs controle.



Outro parâmetro avaliado foi o peso. Nos primeiros quatro dias de estudo, os animais que receberam a PDCM, exclusivamente na dose de 1000 mg/kg, apresentaram menor peso em relação ao grupo controle (figura 19).

Figura 19: Efeito da PDCM de *S. guianensis* sobre o ganho de peso corporal dos camundongos durante 14 dias. Controle (veículo) e PDCM (Doses de 100, 250, 500 e 1000 mg/kg). Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do ganho de peso em gramas. ANOVA, seguida por Bonferroni. Valores significativos: $p^{*}<0,05$ vs controle.



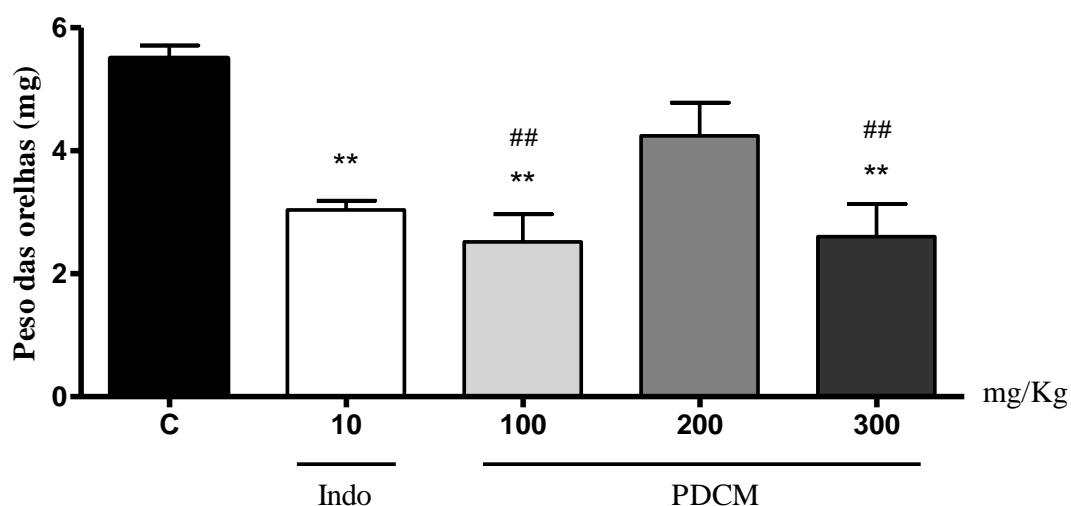
4.5.2 Atividade anti-inflamatória

4.5.2.1 Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton

Quando administradas por v.o., as doses de 100 e 300 mg/kg de PDCM e a indometacina foram capazes de reduzir significativamente o edema em 54, 52 e 44%,

Figura 20: Efeito da PDCM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pelo óleo de cróton em camundongos. Controle (veículo), Indometacina (Indo-10mg/kg) e PDCM (Doses de 300, 200 e 100mg/kg) foram administrados via oral 60 min antes da aplicação tópica de óleo de cróton 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média± e.p.m. da diferença de peso entre orelhas (mg). ANOVA, seguida pelo teste de Newman-keuls. Valores significativos: ** $p < 0,01$ vs controle. ## estatisticamente igual a indometacina.

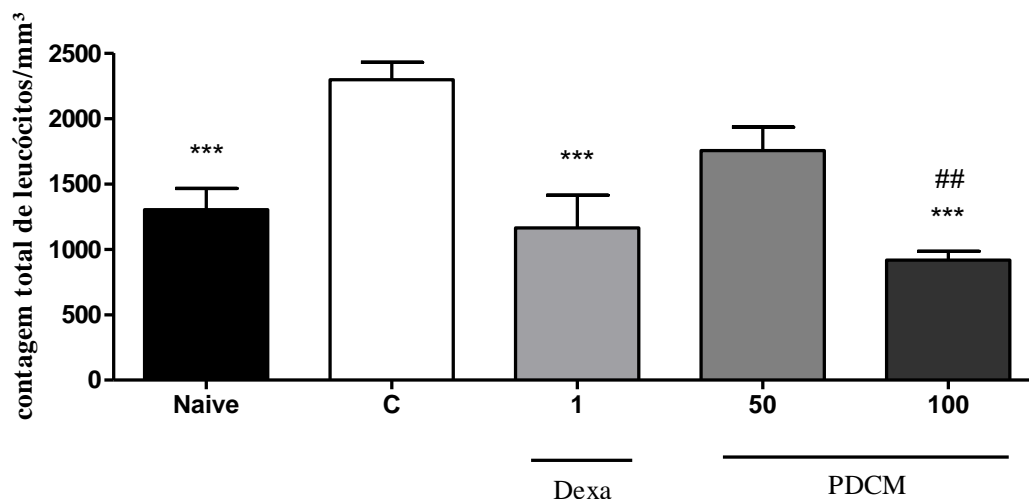
Os valores em cada coluna representam a média± e.p.m. da diferença de peso entre orelhas (mg).



4.5.2.2 Modelo de peritonite induzido por LPS

Quando administradas por v.o., PDCM (100 mg/kg), e dexametasona (1mg/kg) foram capaz de reduzir o infiltrado leucocitário em 53 e 32%, respectivamente. A dose de 50 mg/kg da PDCM não apresentou atividade.

Figura 21: Efeito da PDCM via oral diante do estímulo inflamatório induzido pela aplicação i.p. de LPS. Naive (salina i.p.), Controle negativo (veículo), dexametasona (dexa-1mg/kg) e PDCM (Doses de 50 e 100mg/kg) foram administrados via oral 60 min antes da aplicação i.p. de LPS. Os valores em cada coluna representam a média± e.p.m. do número de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais. ANOVA, seguida pelo teste de Tukey. Valores significativos: *** $p < 0,05$ vs controle. ## estatisticamente igual a dexametasona.

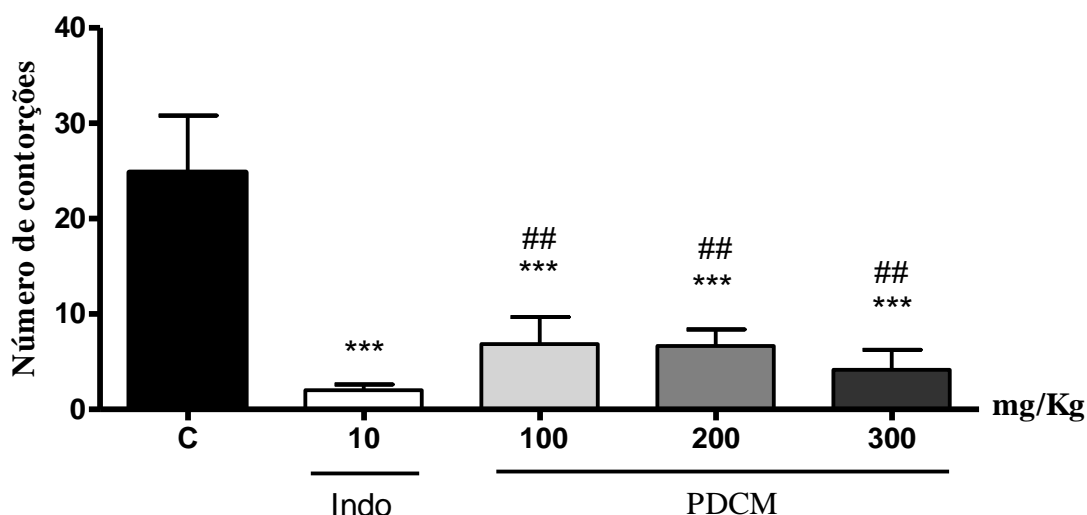


4.5.3 Atividade antinociceptiva

4.5.3.1 Teste de contorções abdominais induzida por ácido acético

Quando administrada por v.o., a PDCM foi capaz de reduzir significativamente o número de contorções abdominais durante os 30 min de avaliação experimental em todas as doses testadas, quando comparadas ao grupo tratado com salina (controle negativo). O controle positivo, indometacina (10mg/kg), como esperado, reduziu significativamente as contorções em 92%. A inibição calculada para a PDCM foi de 67%, 71% e 83% nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg, respectivamente.

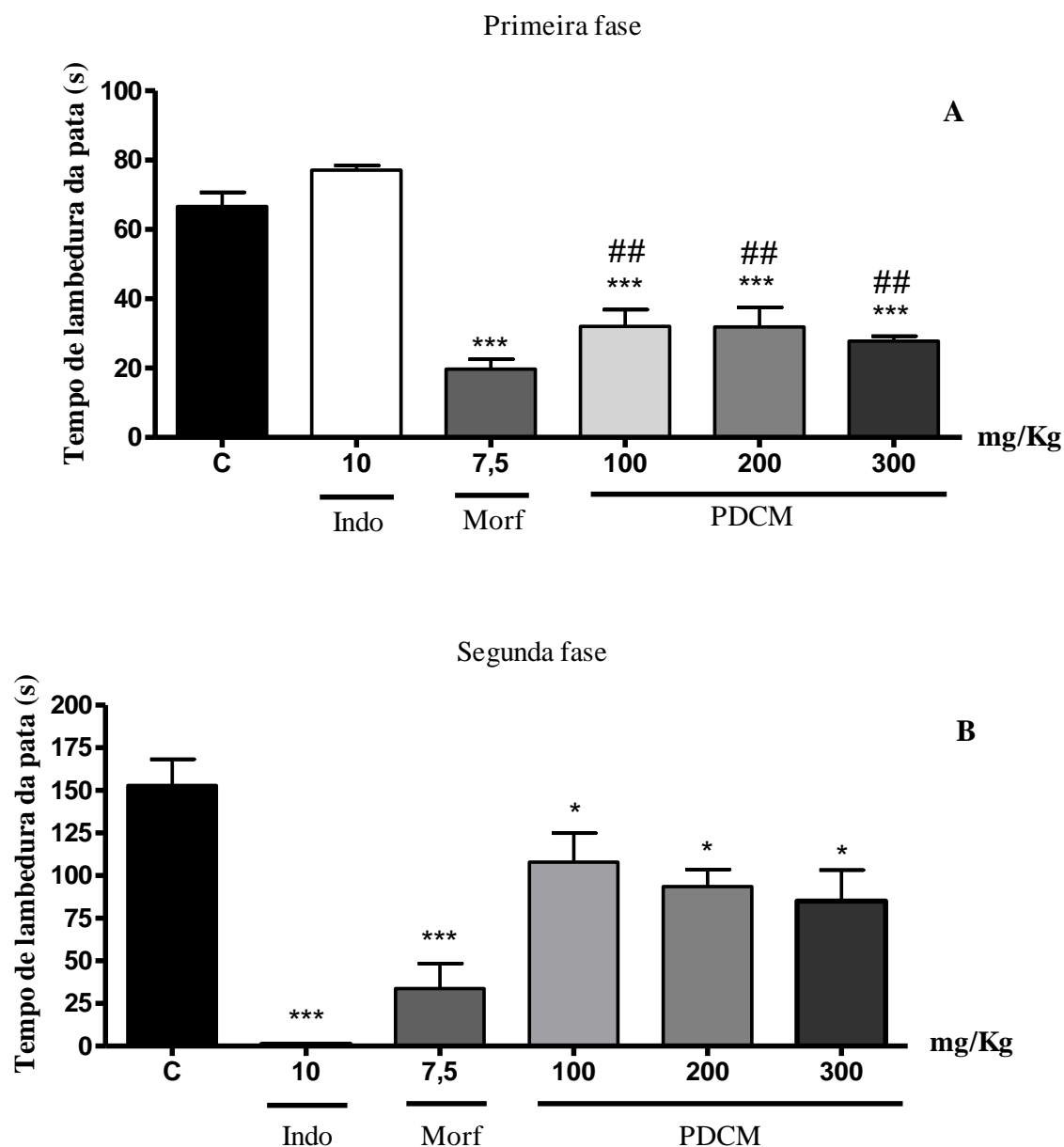
Figura 22: Efeito de *S. guianensis* via oral, sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Controle (veículo), indometacina (Indo-10mg/kg) e PDCM (doses de 300, 200 e 100 mg/kg) foram administrados 60min antes da injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% e o número de contorções abdominais foi avaliada durante 30min. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do número de contorções abdominais. ANOVA, seguida por Newman-keuls. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ vs controle. ## estatisticamente igual à Indometacina.



4.5.3.2 Teste da formalina

Como observado na figura 23A, na primeira fase do teste (0-5 min), todas as doses da PDCM (100, 200 e 300 mg/kg) foram eficazes reduzindo em 56, 54 e 48%, respectivamente, o tempo de lambida da pata afetada quando comparada ao controle. A morfina, como esperado, reduziu significativamente o tempo de lambida em 70%. É necessário salientar que a indometacina, também utilizada como fármaco de referência, não foi capaz de inibir a nocicepção de origem neurogênica. A figura 23B demonstra que os fármacos de referência, bem como a PDCM, inibiram significativamente a nocicepção de origem inflamatória (2ª fase da dor- 15 a 30 min). A indometacina e morfina inibiram 99,3 e 78% a nocicepção e a PDCM nas doses de 100, 200 e 300 mg/kg inibiram 29; 38 e 44%, respectivamente.

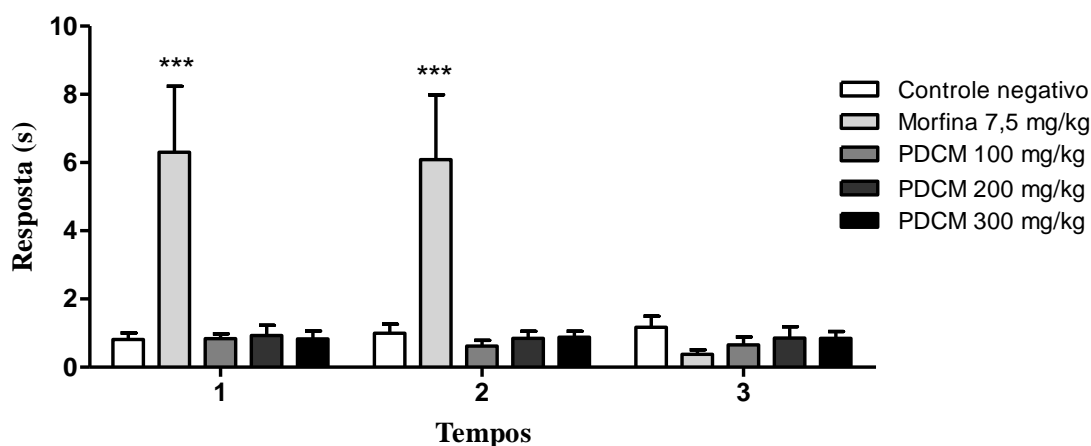
Figura 23: Efeito de *S. guianensis*, indometacina via oral e morfina via intraperitoneal, sobre o tempo de lambertura de pata (S) na 1ª fase (A) e 2ª fase (B) do teste da formalina sobre camundongos. Controle (veículo), indometacina (Indo-10 mg/kg), morfina (Morf-7,5 mg/kg) e PDCM (300, 200 e 100 mg/kg) foram administrados 45 ou 60 min antes da administração subplantar de formalina 2,5%. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. do tempo de lambertura da pata (S). ANOVA, seguida por Newman-keuls. Valores significativos: $p^{***}<0,001$; $p^{*}<0,05$ vs controle. ## estatisticamente igual à morfina.



4.5.3.3 Teste da retirada da cauda (Tail-Flick)

Como pode ser observado na figura 24, PDCM em nenhuma concentração foi capaz de alterar o período de latência ao estímulo nocivo aplicado no teste em questão. Entretanto, o tratamento com morfina foi eficaz nos tempos 1 e 2, aumentando de forma significativa o período de latência ao estímulo térmico.

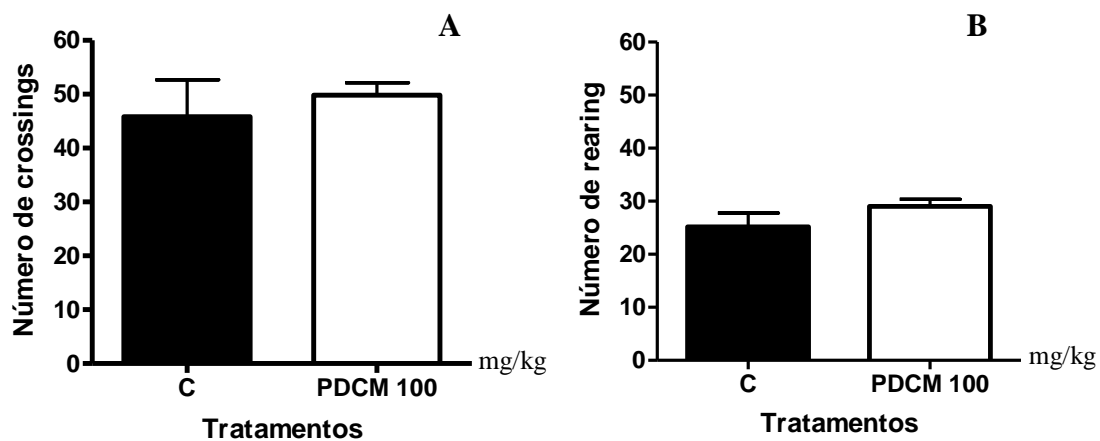
Figura 24: Efeito de *S. guianensis* via oral e morfina via intraperitoneal sobre o tempo de reação no teste de retirada da cauda. Controle (veículo), morfina (7,5 mg/kg) e PDCM (100, 200 e 300 mg/kg) foram administrados 30 ou 60 min antes do estímulo térmico nocivo à cauda do do animal. Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. da diferença entre os tempos basais de retirada da cauda e nos momentos 1, 2 e 3. ANOVA, seguida por Bonferroni. Valores significativos: $p^{***}<0,001$ vs controle.



4.5.4 Avaliação da atividade locomotora (*open-field*)

Como observado na figura 25, o tratamento, v.o., com a PDCM 100 mg/kg não afetou a locomoção dos animais (crossing ou rearing).

Figura 25: Efeito da PDCM, v.o., na atividade locomotora dos animais. A: Número de crossings (número de vezes que o animal cruza de um quadrante para o outro) – B: Rearing (número de vezes que o animal explorou o ambiente, levantando o corpo sob as patas traseiras). Os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m do número de crossings (A) e rearings (B). ANOVA, seguida por Teste t de Student.



5 DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO E ISOLAMENTO DOS CONSTITUINTES DA PDCM

PDCM exibiu perfil cromatográfico complexo devido à presença de muitas substâncias na amostra (figura 9/pag.50). As substâncias A e B apresentaram espectros de absorção UV (picos de absorção em λ 200, 265 e 350 nm) característicos de compostos fenólicos, mais especificamente flavonóis (ANDERSEN, MARKHAM 2005). Pontualmente, a absorção em λ 265 nm é característica do anel B e a absorção em λ 350 nm é referente ao anel A de flavonoides (MERKEN, BEERCHER, 2000).

Diferentemente da complexidade observada na PDCM, ao analisar as frações (FD3₁, FD5, FD11, FD13 e FD14) pôde-se constatar a eficiência do processo de fracionamento, visto que estas apresentaram perfis cromatográficos menos complexos.

FD3₁ exibiu alto grau de pureza com a presença de apenas um sinal, nomeado de D, (figura 10/pág.50) em CLAE. FD5 e FD11 foram submetidas à CLAE semipreparativa para isolamento das substâncias E (figura 11/pág.51) e F (figura 12/pág.51), respectivamente. A análise fitoquímica em CCD para estas amostras foi característico para terpenos em FD5 e flavonoides em FD11. O isolamento forneceu 8 mg da substância E, enquanto a substância F, isolada de FD11 por CLAE semipreparativa, não apresentou massa significativa para posterior análises e ensaios.

As substâncias D e apresentaram bandas no espectro de ultravioleta com máximos de absorção em aproximadamente 225 nm. Tal fato sugere tratar-se de moléculas predominantemente saturadas, contendo pouca ou nenhuma conjugação, sem presença de ligações duplas conjugadas, porém possuindo substituintes auxocrômicos que aumentam as intensidades de absorção no UV (PAVIA et al., 2010). Devido às características físico-químicas das substâncias, a cor azul observada em CCD de sílica quando reveladas com vanilina/ácido sulfúrico, e o deslocamento das bandas de luz UV sugere tratar-se de substâncias de natureza terpenóide. Para as substâncias F, G, H, I, J, K e L o espectro ultravioleta obtido apresentou bandas de absorção em λ 200, 265 e 350 nm, as quais são representativas de flavonóis, corroborando resultado encontrado em CCD de sílica, que após a aspersão de NP-PEG permitiu a visualização de bandas amarelo-fluorescentes (ANDERSEN, MARKHAM, 2005).

5.2 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E TEOR DE FENÓLICOS E FLAVONOIDES

Os modelos para se determinar a atividade antioxidante de uma amostra são inúmeros, desta forma torna-se necessário o uso de mais de uma técnica, a fim de avaliar etapas distintas do estresse oxidativo (KRISHNAIAH, SARBATLY, NITHYANANDAM, 2011). Neste trabalho optou-se por utilizar ensaios que têm por base a redução de radicais livres (método do DPPH e fosfomolibidênio) e inibição do processo de peroxidação lipídica (método do β -caroteno/ácido linoleico e TBA).

O método do DPPH muitas vezes é utilizado para fins de triagem de amostras e substâncias com capacidade antioxidante. Isto se deve à facilidade de obtenção do reagente, sensibilidade e execução do experimento (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012; ZOU et al., 2011). A substância 2,2-difenil-1-picrilhidrazil é um radical livre nitrogenado estável. Na presença de antioxidantes, estes são capazes de doar elétrons ou átomos de hidrogênio à molécula de DPPH, atuando como agentes redutores. Este processo é caracterizado pela transição de uma coloração púrpura (própria da molécula do radical) para uma coloração amarela (característica da forma reduzida), implicando em um decaimento da absorvância da solução a 517 nm. Deste modo é possível dimensionar a atividade antioxidante de uma determinada amostra (BONDET, BRAND-WILLIAMS, BERSET, 1997). Os resultados obtidos para as amostras avaliadas foram expressos em CI_{50} . Nas concentrações de $25,1 \pm 2,19$; $1,31 \pm 0,14$; $0,23 \pm 0,02$ $\mu\text{g/mL}$ a PDCM, quercetina e ácido ascórbico respectivamente, foram capazes de reduzir 50% dos radicais DPPH. Apesar da diferença no valor de CI_{50} da PDCM com os controles testados, o resultado encontrado é promissor e denota o potencial antioxidante da amostra. PDCM é uma amostra complexa constituída de uma mistura de substâncias, enquanto a quercetina e o ácido ascórbico são substâncias puras com atividade antioxidante reconhecida.

Devido algumas limitações do método como a reversibilidade da reação que pode ocasionar leituras subestimadas (MISHRA, OJHA, CHAUDHURY, 2012), e o favorecimento de substâncias mais polares em virtude de características do meio reacional, outros três ensaios foram empregados: método do fosfomolibidênio, descoramento do sistema β -caroteno ácido linoleico e TBA.

Quanto à solubilidade, o método do fosfomolibidênio é capaz de solucionar esta limitação, visto que sua grande vantagem é a capacidade em avaliar tanto a ação de

compostos lipofílicos quanto hidrofílicos. O ensaio baseia-se na redução da molécula de molibdênio (IV) a molibdênio (V) por substâncias antioxidantes, e subsequente formação de um complexo fosfato/Mo (V) de coloração esverdeada em pH ácido, que pode ser determinado espectrofotometricamente a 695 nm (PRIETO, PINEDA, AGUILAR, 1999). O resultado obtido permite a quantificação da capacidade antioxidante total em equivalentes de ácido ascórbico.

A partir da curva de ácido ascórbico encontrou-se que 1 mg da PDCM apresentou a mesma ação antioxidante que 0,35 mg do padrão referido, ou seja, o mesmo que 35% da ação do ácido ascórbico. Apesar da baixa atividade neste modelo o resultado encontrado é relevante, pois PDCM é uma amostra constituída de uma mistura de substâncias e alguns constituintes podem não possuir atividade antioxidante.

Relacionado ainda ao estresse oxidativo, avaliar o processo de peroxidação lipídica é de suma importância, visto que os lipídeos são componentes essenciais das membranas celulares e a oxidação dos mesmos está associada a patologias como diabetes, aterosclerose e até mesmo o câncer (BENZIE, 1996; GHANI et al., 2017; YIN, XU, PORTER, 2011). Este assunto ainda pode ser extrapolado para sistemas alimentares em que a oxidação lipídica muitas vezes produz substâncias tóxicas e que provocam perdas nutricionais aos alimentos (GHANI et al., 2017).

O método do β -caroteno/ácido linoleico propicia a formação de um ambiente pro-oxidante que leva a degradação oxidativa da molécula de ácido linoleico. Os produtos de peroxidação formados propiciam o descolorimento do β -caroteno, desta forma este processo pode ser aferido por meio de medidas espectrofotométricas (KADIR et al., 2014; KANATT et al., 2015). Assim sendo este ensaio mimetiza, em parte, processos de peroxidação lipídica que ocorrem no organismo permitindo investigar e avaliar propriedades de uma amostra em inibir os radicais livres formados (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

PDCM inibiu a peroxidação do ácido linoleico de maneira dependente da dose, obtendo maior percentual de inibição (63,54%) para maior dose (222 $\mu\text{g/mL}$), ocorrendo uma redução do mesmo para 16,44% na menor concentração testada (9,50 $\mu\text{g/mL}$). A quercetina, utilizada como controle, é um potente inibidor do processo de lipoperoxidação sendo capaz de exercer forte ação antioxidante mesmo em baixas concentrações. No

ensaio em questão exibiu percentual de inibição igual a 83,63% na maior concentração e 71,21% na menor.

Um dos produtos formados durante a peroxidação lipídica é um derivado aldeídico chamado malonaldeído (MDA). Este tem sido extensivamente estudado, uma vez que é utilizado como marcador de dano oxidativo em sistemas biológicos, e está associado à alteração de aroma e sabor em carnes (GHANI et al., 2017). Uma forma de quantificar MDA é por meio do método do TBA. As substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico são um grupo de compostos de baixo peso molecular formados quando peróxidos são oxidados a aldeídos ou cetonas, exemplo destes são a acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o próprio MDA. O último reage com duas moléculas de TBA em meio ácido e temperatura elevada, resultando na formação de um complexo TBA-MDA de coloração rosa que pode ser detectado espectrofotometricamente a 535 nm (BENZIE, 1996).

Como pode ser observado na figura 17, a oxidação lipídica ocorreu desde o dia 1. Durante os quatro dias de experimento, a produção de MDA foi significativamente reduzida nas amostras que continham BHT, em todas as concentrações, e na PDCM (em todas as concentrações), quando comparado ao controle negativo. Somente a menor concentração da amostra (7,5 mg) foi estatisticamente igual ao controle positivo, na mesma concentração, e durante todos os dias.

A literatura traz exemplos de substâncias que possuem atividade antioxidante reconhecida e que, de acordo com o ambiente reacional e concentração, podem perder esta atividade ou até mesmo se tornarem pró-oxidantes. Um deles é o α -tocoferol que, devido ao seu potencial redox, necessita de um ambiente favorável que regenere o radical α -tocoferila a α -tocoferol (CERQUEIRA, DE MEDEIROS, AUGUSTO, 2007). O mesmo pode ocorrer com carotenoides como licopeno, luteína e β -caroteno, que em altas concentrações tem sua capacidade antioxidante reduzida (CERQUEIRA, DE MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; CORADIN, 2008). O ácido ascórbico também pode atuar como pró-oxidante na presença de metais com mais de um estado de valência, como o Fe^{2+} e o Cu^+ , gerando radicais ascorbato e hidroxila iniciando o processo de peroxidação lipídica (CERQUEIRA, DE MEDEIROS, AUGUSTO, 2007; SUCUPIRA, et al., 2012). Por fim, até mesmo substâncias fenólicas como flavonoides têm sido estudadas quanto à capacidade pró-oxidante devido a sua capacidade redox que, assim como o α -tocoferol,

necessita de um conjunto de outras substâncias para regenerar sua forma reduzida (HEIM, TAGLIAFERRO, BOBILYA, 2002).

Os constituintes fenólicos têm sido considerados a classe de metabólitos especiais com maior potencial antioxidante (WOJTUNIK, CIESLA, WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2014). Os flavonoides, como um dos representantes desta classe, são moléculas com hidroxilas fenólicas que desempenham a excelente função de doar hidrogênios participando da extinção de radicais livres e, no caso de substratos lipídicos, produzindo derivados menos reativos, prevenindo a auto-oxidação natural do processo. Suas propriedades multifuncionais ainda garantem a quelação de metais e inibição de enzimas associadas ao estresse oxidativo (BANJARNAHOR, ARTANTI, 2014; BUBOLS et al., 2013). Já foram identificados flavonoides na espécie que têm atividade antioxidante descrita, são eles o canferol (RATHEE et al., 2009) e quercetina (BAGHEL et al., 2012; BOOTS, HAENEN, BAST et al., 2008), com seus respectivos derivados glicosilados, vicentina 2 (UMA DEVI et al., 2000) e a forma dimérica da procianidina B1 (LU, FOO, 2000; SOOBRAATTEE et al., 2005). Apesar de não identificados na PDCM estas substâncias podem estar presentes contribuindo para a ação encontrada.

Ao verificar o teor de fenólicos e flavonoides na PDCM, encontramos o valor de 84 µg fenólicos/mg amostra e 73,64 µg flavonoides/mg amostra.

Além dos polifenóis, outros metabólitos possuem propriedades antioxidantes, exemplo disto são os constituintes terpênicos (WOJTUNIK, CIESLA, WAKSMUNDZKA-HAJNOS, 2014). A investigação desta propriedade para esta classe ainda é escassa, acredita-se que menos de 10% de todos os terpenos identificados têm seu potencial antioxidante investigado. Características estruturais têm sido intimamente relacionadas com a atividade encontrada. Terpenos oxigenados, com presença de sistema de conjugação e hidroxila fenólica, atuam de maneira eficiente na estabilização de radicais livres e peróxidos lipídicos (GONZALEZ-BURGOS, GOMEZ-SERRANILLOS, 2012; ZEKOVIĆ et al., 2016). Deste modo conclui-se que o potencial antioxidante encontrado para a PDCM possa ser devido à presença dessas classes de metabólitos na amostra.

5.3 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

O uso de produtos naturais pela população vem transpondo a etnobotânica e se tornando uma realidade devido à comprovação científica de eficácia de algumas espécies vegetais (DA SILVEIRA, BANDEIRA, ARRAIS, 2008; OUEDRAOGO et al., 2012). Entretanto os ensaios de toxidez para muitas destas são escassos, evidenciando a importância na avaliação de sua segurança para uso humano e animal (GRANDO, 2013).

Todavia, de forma a prever a segurança toxicológica de PDCM, foi realizado o ensaio de toxidez oral aguda. Neste foram avaliados quatro parâmetros: massa relativa dos órgãos, consumo diário de água, consumo diário de ração e peso dos animais, além de sinais tóxicos de caráter geral e possíveis óbitos.

Durante o estudo toxicológico não houve óbitos e não foram observadas alterações morfológicas nos órgãos avaliados. Ao avaliar a massa relativa dos mesmos e o consumo diário de água, não foram evidenciadas diferenças estatísticas em relação ao controle negativo. A DL_{50} oral determinada para esta amostra foi maior que 1g/kg em camundongos. Substâncias com valores de DL_{50} acima de 1g/kg por via oral são consideradas atóxicas ou de baixa toxidez (CLARKE, CLARKE, 1977; UGWAH-OGUEJIOFOR et al., 2011).

Ao avaliar a variação de massa corporal foi observada ligeira redução de ganho de massa nos primeiros quatro dias nos animais tratados com PDCM 1000mg/kg, quando comparados ao controle. No entanto, essa diferença foi revertida ao término do experimento. Após os catorze dias, houve ganho de massa em todos os grupos e não houve diferenças significativas entre as massas finais.

O consumo de ração aumentou para os animais tratados com a PDCM na dose de 500 mg/kg pontualmente no 2º e 9º dias do experimento.

Desta forma, estudos de toxidez em longo prazo podem ser realizados para melhor elucidação dos efeitos observados.

Com o intuito de avaliar a ação anti-inflamatória da PDCM foram realizados os ensaios anti-inflamatórios pelo método do edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, e o modelo de peritonite aguda induzida por LPS.

O óleo de cróton é um agente flogístico altamente irritante que possui como componente majoritário o princípio ativo 13-acetato de 12-o-tetradecanoilforbol (TPA) (LAPA, 2003). A resposta inflamatória cutânea induzida é caracterizada por intensa vasodilatação e formação de eritema, seguido do aumento da espessura da orelha em consequência do extravasamento celular que atinge o pico máximo na sexta hora. Assim, é possível dimensionar o processo inflamatório por meio da intensidade do edema, que é verificada por meio da diferença de peso das orelhas (TUBARO, 1995). Sua ação envolve a ativação da proteína quinase C (PKC), aumentando a permeabilidade vascular, induzindo a síntese de metabólitos do AA e desencadeando a expressão da COX-2, IL-1 β , TNF- α e de moléculas de adesão (CHI et al, 2003; DE YOUNG et al., 1989; PINHEIRO et al., 2011). Portanto, devido a seu amplo mecanismo de ação são identificados neste modelo tanto compostos com atividade *corticoid-like*, como substâncias que interferem no metabolismo do AA, como inibidores de COX e/ou LOX (GABOR, 2000).

Quando administrada por via oral, a PDCM nas doses de 100 e 300 mg/kg, e a indometacina, 10mg/kg, reduziram significativamente o edema em 54, 52 e 44%, respectivamente, comparado ao grupo controle negativo. A dose de 200 mg/kg, por sua vez não foi efetiva no modelo testado.

No modelo de peritonite aguda a resposta inflamatória desencadeada na cavidade peritoneal é caracterizada por dor, infiltração leucocitária e síntese de mediadores pró-inflamatórios (DA SILVA et al., 2014). O LPS, também conhecido como endotoxina, é uma molécula presente na parede celular de bactérias gram-negativas. Este, por sua vez, é considerado um padrão molecular associado a patógenos (PAMP), responsável pela ativação de receptores de reconhecimento padrão (PRR) denominados *toll-like*. Estes receptores são proteínas transmembrana encontrados na superfície de células imunocompetentes como macrófagos, células dendríticas e neutrófilos. Mais especificamente o tipo 4 (TLR4) é responsável pelo reconhecimento deste tipo de lipopolissacarídeo, desencadeando a ativação de vias de sinalização intrínsecas, que culminarão na expressão de citocinas inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-6) e expressão de moléculas de adesão, por exemplo (FERRAZ et al., 2011). Por conseguinte um gradiente quimioatraente é gerado por macrófagos residentes levando ao recrutamento de leucócitos polimorfonucleares, dos quais mais de 90% são neutrófilos (AJAYI et al., 2017). Deste

modo a infiltração leucocitária pode ser um dos parâmetros para avaliar o processo inflamatório.

Neste modelo foram escolhidas as doses de 50 e 100 mg/kg de PDCM, isto porque como visto nos ensaios anteriores as doses usuais (100, 200 e 300 mg/kg) quando ativas não diferiam estatisticamente, e a fim de avaliar se uma dose menor poderia ser ativa optou-se por testar PDCM 50 mg/kg. Quando administrada por via oral, a PDCM, na dose de 100 mg/kg, e a dexametasona, reduziram o infiltrado leucocitário em 53 e 32%, respectivamente comparado ao grupo controle negativo. A dose de 50 mg/kg não apresentou atividade. Este resultado é de suma importância, pois corrobora com os resultados encontrados no edema de orelha induzido pelo óleo de cróton, o que evidencia a ação da anti-inflamatória de PDCM.

Outro potencial investigado foi a atividade antinociceptiva da PDCM. Para avaliação e maior entendimento desta atividade, foram utilizados três modelos experimentais que avaliaram tanto a nocicepção de origem central, quanto periférica desencadeadas por estímulo químico (contorções abdominais induzidas por ácido acético e nocicepção mediada por formalina) e térmico (Teste de retirada da cauda – *Tail flick*).

O ácido acético, ao ser injetado i.p. em camundongos, é responsável por manifestações comportamentais características, como contorções intermitentes do abdômen, torções do tronco e extensão das patas traseiras, tornando-se possível a avaliação experimental (GUO et al., 2008; WHITE, 1964). A lesão tecidual causada por este, favorece a síntese e a liberação de metabólitos do ácido araquidônico e de outros mediadores da inflamação, como a bradicinina e a histamina. Ao mesmo tempo, macrófagos e basófilos presentes na cavidade abdominal são ativados ocasionando a liberação de citocinas como TNF- α , IL-1, IL-6 e IL-8 (LIMA et al., 2010; PINHEIRO et al., 2011).

Os prótons oriundos da dissociação deste ácido ativam canais iônicos localizados em fibras aferentes primárias promovendo influxo de Ca^{++} , despolarizando a fibra nervosa e permitindo a abertura de canais de Na^{+} sensíveis à voltagem, conseqüentemente potenciais de ação são desencadeados permitindo a propagação neuronal do estímulo nociceptivo (ZIEGLGANSBERGER; BERTHEKE; TOLLE, 2005).

Portanto utilizamos um modelo que mimetiza a nocicepção inflamatória visceral que é muito empregado no *screening* de novos agentes antinociceptivos e anti-inflamatórios, pois além de ser simples e sensível, desencadeia uma resposta cuja intensidade depende da interação dos vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção (LAPA et al., 2008; YIN et al., 2016). Respondem a este ensaio compostos anti-histamínicos, parassimpatomiméticos, estimulantes do sistema nervoso central, inibidores da mono-aminoxidase (MAO), antagonistas serotoninérgicos, neurolépticos e bloqueadores adrenérgicos podem também inibir as contorções (RATES, BARROS, 1994).

O tratamento com a PDCM foi eficaz em reduzir, significativamente, as contrações abdominais em todas as doses testadas. Particularmente na maior dose, 300 mg/Kg, houve inibição das contorções abdominais em 83%, sugerindo a ação antinociceptiva da mesma.

Embora este resultado possa sugerir um efeito antinociceptivo da PDCM, o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético não é suficiente para indicar se a antinocicepção foi central ou periférica. Portanto, o teste da formalina, com sua maior especificidade, permite uma melhor elucidação do modo de ação de PDCM.

A injeção de formalina, por via s.pl., ocasiona a estimulação de fibras nociceptivas aferentes produzindo nocicepção intensa que é caracterizada por lambidas, mordidas repetitivas e balanço vigoroso da pata injuriada (TJOLSEN et al.; 1992; TORRICO et al., 2013). A resposta nociceptiva desencadeada por este ensaio é persistente e tem caráter bifásico, sendo as duas fases distintas química e farmacologicamente. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina, se estendendo pelos primeiros 5 min. É caracterizada pela estimulação direta dos nociceptores, predominantemente fibras aferentes do tipo C e, em parte, as do tipo A δ , desencadeando a liberação de NO, SP e aminoácidos excitatórios, por exemplo (HUNSKAAR, BERGER, HOLE 1986; HUNSKAAR, HOLE, 1987; ZHANG, REN, 2011). Então, há uma interfase de aproximadamente 10 min (5 a 15 min) na qual existe redução da atividade nociceptiva pela ativação dos mecanismos homeostáticos de antinocicepção, que envolvem principalmente o neurotransmissor GABA. Em seguida, a segunda fase, de 15 a 30 minutos, é caracterizada pelo aparecimento da dor de origem inflamatória devido

à formação e liberação de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, serotonina, histamina e bradicinina (HUNSKAAR, HOLE, 1987; QUINTANS-JÚNIOR et al., 2011).

Devido a esta distinção farmacológica que pode ser observada no ensaio, opioides, como a morfina e alguns agonistas das vias descendentes são capazes de inibir ambas as fases, enquanto corticosteroides e AINES, como a indometacina, tem ação satisfatória apenas na segunda fase (RANG et al., 2016; ROSELAND et al., 1990).

Os resultados obtidos sugerem uma resposta bifásica da PDCM. Todas as doses testadas foram eficazes em ambas as fases, assim como a morfina. Entretanto, é possível observar que a amostra foi mais expressiva na primeira fase, onde temos o predomínio da dor neurogênica. A indometacina, como esperado, foi capaz de inibir a nocicepção somente na segunda fase. Assim, podemos inferir que a PDCM exerce sua ação antinociceptiva atuando tanto em componentes nociceptivos neurogênicos como inflamatórios.

Dando continuidade aos estudos, foi realizado o teste de retirada da cauda ou “*tail flick*”. Diferentemente dos descritos anteriormente, este é um teste algesimétrico neurogênico, responsável por desencadear uma resposta nociceptiva exclusivamente em nível central. A resposta é desencadeada devido à aplicação de uma fonte radiante de calor, o que determina um efeito de retirada da cauda. Esta ação é resultante da ativação direta dos nociceptores pelo calor, que conduzem o estímulo doloroso ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais. Portanto, avalia-se o limiar nociceptivo pelo tempo de latência de retirada da cauda da fonte de calor. Os mecanismos químicos e farmacológicos associados a essa resposta ainda não estão completamente elucidados, porém sabe-se que, como em toda resposta reflexa, tem-se um envolvimento de estruturas supra espinhais. Contudo, como já mencionado, este teste é eficaz na determinação da atividade analgésica de agonistas opioides, devido sua ação central, sendo apropriado para prever a analgesia dessas drogas em seres humanos (CARVALHO et al., 2013; XU et al., 2015).

Os resultados mostraram que apenas a morfina causou aumento significativo da latência, visto que em nenhum dos tempos analisados a PDCM foi eficaz. Portanto, pode-se propor a não participação dos compostos ativos, exclusivamente, no sistema opioidérgico.

Por conseguinte, os resultados obtidos sugerem a atividade antinociceptiva da PDCM de *Siparuna guianensis*, visto que foram alcançados resultados significativos em dois dos três testes realizados.

Devido à natureza fundamentalmente comportamental dos ensaios antinociceptivos, foi realizado o teste do campo aberto, *open field*, para avaliar a ação sedativa da PDCM. Para a execução deste, foi utilizada somente a dose de 100 mg/kg, visto que a ação encontrada nos ensaios antinociceptivos não é dose-dependente, ou seja, não houve diferenças estatísticas entre as doses testadas. O objetivo do mesmo foi analisar se a amostra em questão interfere na atividade locomotora dos animais, o que poderia ocasionar resultados falso-positivos. Nesse modelo foi observado que o tratamento agudo v.o. com a PDCM na dose de 100 mg/kg, não causou nenhuma mudança na deambulação (*crossing*), ou na atitude de exploração do meio (*rearing*) dos animais, quando comparado ao grupo controle negativo (solução salina 0,9%).

Tendo em vista os resultados obtidos as ações antinociceptiva e anti-inflamatória encontradas podem ser atribuídas, em parte, aos constituintes terpênicos e flavonoides encontrados na PDCM.

Os flavonoides são metabólitos que já foram descritos na literatura como capazes de aliviar a dor, modificando respostas nociceptivas tanto por mecanismos centrais como periféricos (KUMBHARE, SIVAKUMAR, 2011; YAQEEN et al., 2013). Suas ações centrais decorrem de suas características químicas que permitem que esses metabólitos transponham a barreira hemato-encefálica e interajam como receptores α -adrenérgicos, do tipo GABA e opiáceos em diversos locais do SNC, desencadeando algisia (BAHMANI et al. 2014; PARVIN et al., 2012). Periféricamente, suas ações decorrem de mecanismos anti-inflamatórios que irão evitar a sensibilização dos nociceptores e serão abordados mais detalhadamente a seguir.

Com relação à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com o processo inflamatório, inibindo a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró- inflamatórias (TNF- α e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como PLA₂, COX e LOX, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico, a iNOS (BIESALSKI, 2007; CAZAROLLI et al., 2008; HAVSTEEN, 2002; LOPES et al., 2009; LÓPEZ-POSADAS et al., 2008; KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000; KIM et al., 2004; MIDDLETON,

KANDASWAMI, THEOHARIDES, 2000) e prevenirem danos oxidativos ocasionados pela geração de ROS (AZEVEDO et al., 2013).

Flavonoides previamente identificados nos extratos foliar de *S. guianensis* podem estar relacionadas às atividades encontradas. Quercetina (MARTÍNEZ et al., 2009; UEDA, YAMAZAKI, YAMAZAKI, 2004) e canferol (MAHAT et al., 2010; PARVEEN et al., 2007; RHO et al., 2011), com seus respectivos derivados glicosilados, e vicenina 2 (GORZALCZANY et al., 2011; MARRASSINI et al., 2011) são descritos com atividade anti-inflamatória e nociceptiva, enquanto que lucenina 2 (KIM et al., 2016) e a forma dimérica da procianidina B1 (MACKENZIE et al., 2009; YOUNG et al., 2000) apresentam atividade descrita apenas para ação anti-inflamatória.

As estruturas químicas dos constituintes terpênicos, baixo peso molecular e alta lipossolubilidade, também permitem que estes atinjam o SNC caracterizando uma possível psicoatividade. Deste modo, a ação antinociceptiva central destas moléculas é descrita e atribuída a modulação em sistemas neurotransmissores importantes como glutamatérgico, serotoninérgico, opioide e canabinoide (HARADA, 2005; HART et al., 2000; HAYNES, 2006; PADUCH et al., 2007).

A capacidade anti-inflamatória dos constituintes terpênicos é atribuída a inibição de enzimas como PLA₂ e iNOS, evitando a formação de prostanoides a partir do AA e óxido nítrico, respectivamente (PADUCH et al., 2007). Outro ponto de atuação verificado é o sistema NF-KB, responsável pelo controle de uma gama de genes que acabam por regular a transcrição de citocinas pró-inflamatórias como, IL-1, IL-2, IL-4, IL-6 e IFN- γ , quimiocinas, moléculas de adesão e enzimas induzíveis (COX-2 e iNOS) (CALIXTO, OTUKI, SANTOS, 2003; RECIO, ANDUJAR, RIOS, 2012). Desta forma, o processo inflamatório e a nocicepção de origem periférica são modulados.

6 CONCLUSÃO

Este trabalho contribui de maneira significativa para o conhecimento e estudo da espécie *Siparuna guianensis*.

A análise da constituição química da PDCM da espécie e suas frações nos permite inferir que a mesma possui dentre seus componentes, constituintes terpênicos e flavonoides.

PDCM se mostrou promissora diante da avaliação do potencial antioxidante, antinociceptivo e anti-inflamatório, corroborando seu uso popular por diversas comunidades no mundo. Não foram evidenciados sinais de toxidez aguda na administração da PDCM garantindo sua segurança farmacológica.

Este estudo encoraja perspectivas futuras para estudos químicos e farmacológicos mais refinados a fim de se identificar as substâncias bioativas responsáveis pelos efeitos observados bem como esclarecer o seu mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- AGUIAR, R. W.S.; DOS SANTOS, S. F.; DA SILVA MORGADO, F.; ASCENCIO, S.D.; DE MENDONÇA L.M.; VIANA, K.F.; RIBEIRO, B.M, 2015. Insecticidal and repellent activity of *Siparuna guianensis* Aubl.(Negramina) against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **PloS one**, v.10, n.2, p.e0116765, 2015.
- AJAYI, A.M.; MARTINS, D.T.O.; BALOGUN, S.O.; DE OLIVEIRA, R.G.; ASCÊNCIO, S.D.; SOARES, I.M.; ADEMOWO, O.G. *Ocimum gratissimum* L. leaf flavonoid-rich fraction suppress LPS-induced inflammatory response in RAW 264.7 macrophages and peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 204, p.169-178, 2017.
- ALMEIDA, M. R.; MARTINEZ, S. T.; PINTO, A. C.† Química de Produtos Naturais: Plantas que Testemunham Histórias Almeida. **Revista Virtual de Química**, v.9, n.3, p. 1117-1153, 2017.
- ALWANI, M. EL; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171–183, 2006.
- AMARANTE, C.B.; SILVA, J.C.; MULLER, A.H.; MULLER, R.C.S. Avaliação da composição mineral do chá da folha senescente de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae) por espectrometria de absorção atômica com chama (FAAS). **Química Nova**, v. 34, p. 419-423, 2011.
- ANDERSEN, A.; E MARKHAM, C. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications**. New York: CRC Press, 2005.
- ANDRADE, M.A.; CARDOSO, M.D.G.; GOMES, M.D.S.; AZEREDO, C.M. O.D.; BATISTA, L.R.; SOARES, M.J.; RODRIGUES, L.M.A; FIGUEIREDO, A.C.S. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.46, n.1, p.189-194, 2015.
- ANDRADE, M.A.; DAS GRAÇAS C.M.; DE ANDRADE, J.; SILVA, L.F.; TEIXEIRA, M.L.; VALÉRIO R.J.M.; FIGUEIREDO, A.C.S; BARROSO, J.G. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v.2, n.4, p.384-397, 2013.
- ANDRADE, M.A.; DOS SANTOS AZEVEDO, C.; MOTTA, F.N.; DOS SANTOS, M.L.; SILVA, C.L.; DE SANTANA, J.M.; BASTOS, I.M. Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition. **BMC complementary and alternative medicine**, v.16, n.1, p.444, 2016.
- ARGENTA, S.C.; ARGENTA, L.C.; GIACOMELLI, S.R.; CEZAROTTO, V.S. Plantas Medicinais: cultura popular versus ciência. **Revista Eletrônica Vivências**, v.7, n.12, p.51-60, 2011.

- ARCHER, J. Test for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behaviour**, v.21, p. 205-235, 1973.
- ASHLEY, N.T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: mechanisms, costs, and natural variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.
- ATSAFACK, S.S.; KUIATE, J.R.; MOUOKEU, R. S.; MOGTOMO, M.L.K.; TCHINDA, A.T.; DIEU, T. J.; NANA, H. M.; ETAME, R.M.E.; BIYITI, L.; NGANE, R.A. Toxicological studies of stem bark extract from *Schefflera barteri* Harms (Araliaceae). **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 44, 2015.
- AZEVEDO, M. I.; PEREIRA, A. F.; NOGUEIRA, R. B.; ROLIM, F. E.; BRITO, G. A. C.; WONG, D. V. T.; LIMA, R. C. P.; RIBEIRO, R. D.; VALE, M. L. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v.9, p.14, 2013.
- BAGHEL, S.S.; SHRIVASTAVA, N.; BAGHEL, R. S.; AGRAWAL, P.; RAJPUT, S. A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. **World J Pharm Pharmaceutical Sci**, v.1, n.1, p.146-60, 2012.
- BAHMANI, M.; SHIRZAD, H.; MAJLESI, M.; SHAHINFARD, N.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. A review study on analgesic applications of Iranian medicinal plants. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v.7, p. 43-53, 2014
- BANJARNAHOR, S.D.S; ARTANTI, N. Antioxidant properties of flavonoids. **Medical Journal of Indonesia**, v.23, n.4, p.239, 2014.
- BARNES, Peter J. How corticosteroids control inflammation: quintiles prize lecture 2005. **British journal of pharmacology**, v. 148, n. 3, p. 245-254, 2006.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BENZIE, I.F.F. Lipid peroxidation: a review of causes, consequences, measurement and dietary influences. **International journal of food sciences and nutrition**, v.47, n.3, p.233-261, 1996.
- BETTEGA, P.V.C.; CZLUSNIAK, G.R.; PIVA, R.; NAMBA, E.L.; RIBAS, C.R.; GRÉGIO, A.M.T. Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. **Archives of Oral Sciences & Research**, v.7, n. 1, p. 89-97, 2011.
- BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. **Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care**, v.10, n.6, p.724-728, 2007.
- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C.L.W.T. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH. free radical method. **LWT-Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609-615, 1997.
- BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. **European journal of pharmacology**, v.585, n.2, p.325-337, 2008.

BORGES, F.R.; SILVA, M.D.; CORDOVA, M.M.; SCHAMBACH, T.R.; PIZZOLATTI, M.G.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory action of hydroalcoholic extract, dichloromethane fraction and steroid alpha-spinasterol from *Polygala sabulosa* in LPS-induced peritonitis in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, p.144–150, 2014.

BRASIL. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução RE nº 90 de 16.3.2004. Determina a publicação do “**Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**”. Diário Oficial da União, 2004.

BUBOLS, B.G.; VIANNA, D.R.; MEDINA-REMON, A.; VON POSER, P.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; EIFLER-LIMA LUCIA, V.L.; GARCIA, S.C. The antioxidant activity of coumarins and flavonoids. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v.13, n.3, p.318-334, 2013.

BURTON, G.J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v.25, n.3, p.287-299, 2011.

CALDERON, A.I.; ANGERHOFER, C.K.; PEZZUTO, J.M.; FARNSWORTH, N.R.; FOSTER, R.; CONDIT, R.; SOEJARTO, D.D. Forest plot as a tool to demonstrate the pharmaceutical potential of plants in a tropical forest of Panama. **Economic Botany**, v.54, n.3, p.278-294, 2000.

CALIL, A.M.; PIMENTA, C.A.M. Intensidade da dor e adequação de analgesia. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v. 13, p. 692-699, 2005.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy research**, v.14, n.6, p. 401-418, 2000.

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R.S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta medica**, v. 69, n. 11, p. 973-983, 2003.

MUNIZ, C.J.; DA SILVA, L.E. "Mais que isso eu não posso falar": notas sobre benzeduras e parteiragens caiçara em Guaraqueçaba/pr. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, v.12, n.23, 2016.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J. P. D.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, L. C.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com Plantas Mediciniais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v.3, n.2, p. 44-75, 2015.

CARR, D.B.; GOUDAS, L.C. Acute pain. **Lancet**, v. 353, n. 9169, p. 2051-2058, 1999.

CARVALHO, V.; FERNANDES, L.; CONDE, T.; ZAMITH, H.; SILVA, R.; SURRAGE, A.; FRUTOSO, V.; NETO, H.C.F.; AMENDOEIRA, F. Antinociceptive activity of *Stephanolepis hispidus* skin aqueous extract depends partly on opioid system activation. **Marine drugs**, v.11, n.4, p.1221-1234.7, 2013.

CAZAROLLI, L.H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E.H.; FIGUEIREDO, M.S.; FOLADOR, P.; DAMAZIO, R.G.; PIZZOLATTI, M.G.; SILVA, F.R. Flavonoids:

- prospective drug candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.13, p.1429-1440, 2008.
- CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A. C.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L.F.; ROSÁRIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C.; GENEVIÈVE, B. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of ethnopharmacology**, v.123, n.3, p.413-422, 2009.
- CERQUEIRA, F.M.; DE MEDEIROS, M.H.G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.
- CHI, Y. S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v. 66, p. 1271-1278, 2003.
- CIPRIANO, A.; DE ALMEIDA, D.B.; VALL, J. Profile of chronic pain patients seen in a pain outpatient setting of a major Southern Brazil' city. **Revista Dor**, v.12, p. 297-300, 2011.
- CLARKE, E.G.C; CLARKE, M.L. **Veterinary Toxicology**. Baltimore: Williams e Wilkins, p. 268-277, 1997.
- COLACITE, J. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva de *Baccharis dracunculifolia* DC E *Bryophyllum pinnatum* Kurtz. **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 10, n. 3, p. 49-58, 2015.
- CORADIN, L. **Fontes brasileiras de carotenóides: tabela brasileira de composição de carotenóides em alimentos**. Ministério do Meio Ambiente, Departamento de Conservação da Biodiversidade, 2008.
- COSTA-SILVA, J.H.; LIMA, C.R.; SILVA, E.J.R.; ARAÚJO, A.V.; FRAGA, M.C.C.A.; RIBEIRO E RIBEIRO, A.; ARRUDA, A.C.; Lafayette, S.S.L.; Wanderley, A.G. Acute and subacute toxicity of the *Carapa guianensis* Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.116, p.495-500, 2008.
- COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, n.5, p.359-371, 2005.
- COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, 2008.
- CRAGG, G.C.; GROTHAUS, P.G.; NEWMAN, D.J. Impact of Natural Products on Developing New Anti-Cancer Agents. **Chemical Reviews**, v.109, n. 7, p. 3012-43, 2009.
- D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, p.74-79, 1941.
- DA SILVA, A.O.; ALVES, A.D.; DE ALMEIDA, D.A.T.; BALOGUN, S.O.; DE OLIVEIRA, R.G.; AGUIAR, A.A.; MARTINS, D.T.O. Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia longiflora* (Desf.) Müll. Arg. **Journal of ethnopharmacology**, v.154, n.2, p.319-329, 2014.

- DA SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 4, p. 618-626, 2008.
- DAVIS, E.W.; YOST, J.A. The ethnomedicine of the Waorani of Amazonian Ecuador. **Journal of Ethnopharmacology**, v.9, n.2-3, p.273-297, 1983.
- DE BESSA, N.G. F.; PEREIRA, M.E.A.B.; FERRAZ, V.; POLETTO, K.Q.; JUNIOR, A.I.F.C.; ALVES, A. Antimicrobial activity and medicinal biomass of *Siparuna guianensis* in Brazilian Cerrado forest, a global hotspot. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.9, n.37, p.968-980, 2015.
- DE OLIVEIRA, A.R.M.; SZCZERBOWSKI, D. Quinina: 470 anos de história, controvérsias e desenvolvimento. **Química Nova**, v.32, n.7, p. 1971-1974, 2009.
- DE YOUNG, L.M., KHEIFETS, J.B., BALLARON, S.J., YOUNG, J.M. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. **Agents and Actions**, v. 26, p.335-341, 1989.
- DOWD, L. E. Spectrophotometric determination of quercetin. **Analytical Chemistry**, v.31, n.7, p.1184-1187, 1959.
- DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.;GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446, 2006.
- ELLER, G. J.; JAQUES, A. E. O enfermeiro e as terapias complementares para o alívio da dor. **Arquivos de Ciência da Saúde da UNIPAR**, v. 10, n. 3, p. 185-190, 2006.
- FACUNDO, V.A.; AZEVEDO, M.S.; RODRIGUES, R.V.; NASCIMENTO, L.F.D.; MILITÃO, J.S.; DA SILVA, G.V.; BRAZ-FILHO, R. Chemical constituents from three medicinal plants: *Piper renitens*, *Siparuna guianensis* and *Alternanthera brasiliana*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.5, p.1134-1139, 2012.
- FERRAZ, E.G.; SILVEIRA, B.B.D.B.D.; SARMENTO, V.A.; SANTOS, J.N.D. Receptores Toll-Like: ativação e regulação da resposta imune. RGO. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v.59, n.3, p.483-490, 2011.
- FERREIRA, T.P.; OLIVEIRA, E.E.; TSCHOEKE, P.H.; PINHEIRO, R.G.; MAIA, A.M.S.; AGUIAR, R.W.S. Potential use of Negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) essential oil to control wax moths and its selectivity in relation to honey bees. **Industrial Crops and Products**, v.109, p.151-157, 2017.
- FERRERO-MILIANI, L., NIELSEN, O.H., ANDERSEN, P.S., GIRARDIN, S.E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1beta generation. **Clinical and Experimental Immunology**, v.147, n.2, p. 227-35, 2007.
- FISCHER, D.C.; LIMBERGER, R.P.; HENRIQUES, A.T.; MORENO, P.R. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.17, n.1, p.101-102, 2005.

- FISCHER, D.C.H.; DE AMORIM G.N.C.; BACHIEGA, D.; CARVALHO, C. S.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; ALVES, M.O; YOGI, A.; DI SANTI, S.M.; AVILA, P.E.; KIRCHGATTER, K.; MORENO, R.H. In vitro screening for antiplasmodial activity of isoquinoline alkaloids from Brazilian plant species. **Acta tropica**, v.92, n.3, p.261-26, 2004.
- BRAZ, F.R.; GABRIEL, S. J.; GOMES, C. M.; GOTTLIEB, O. R.; BICHARA, M. D. G.; MAIA, J. G. Oxoaporphine alkaloids from *Fusea longifolia* and *Siparuna guianensis*. **Phytochemistry**, v.15, n.7, p.1187-1188, 1976.
- FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v.73, p.627, 1927.
- FRANKEL, S.; BERENBAUM, M. Effects of light regime on antioxidant content of foliage in a tropical forest community. **Biotropica**, p. 422-429, 1999.
- GABOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Budapest: Akadémiai Kiadó, p.336, 2000.
- GEORGE, D.R.; EDRIS, W.; HANSON, R.; GILMAN, F. Medicinal plants—the next generation. **The Lancet**, v. 387, n. 10015, p. 220-221, 2016.
- GHANI, M. A., BARRIL, C., BEDGOOD, D. R., PRENZLER, P. D. Measurement of antioxidant activity with the thiobarbituric acid reactive substances assay. **Food Chemistry**, v.230, p. 195-207, 2017.
- GILROY, D.W.; NEWSON, J.; SAWMYNADEN, P.; WILLOUGHBY, D.A.; CROXTALL, J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **FASEB Journal**, v.18, p.489-498, 2004.
- GOLDBERG, D. S.; MCGEE, S. J. Pain as a global public health priority. **BMC public health**, v. 11, n. 1, p. 1, 2011.
- GONZALEZ-BURGOS, E.; GOMEZ-SERRANILLOS, M. P. Terpene compounds in nature: a review of their potential antioxidant activity. **Current medicinal chemistry**, v.19, n.31, p.5319-5341, 2012.
- GORZALCZANY, S.; MARRASSINI, C.; MINO, J.; ACEVEDO, C.; FERRARO, G. Antinociceptive activity of ethanolic extract and isolated compounds of *Urtica circularis*. **Journal of ethnopharmacology**, v.134, n.3, 733-738, 2011.
- GRANDO, R. ***Pterodon pubescens* BENTH.: Avaliação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso e atividade anti-artrite reumatoide do extrato diclorometano em modelos animais**. Dissertação (Mestrado em Biociências e Tecnologia de Produtos Bioativos) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2013.
- GULCIN, I.; BEYDEMIR, S. Phenolic compounds as antioxidants: carbonic anhydrase isoenzymes inhibitors. **Mini reviews in medicinal chemistry**, v.13, n.3, p.408-430, 2013.

GUO, L. YE. C.; CHEN, W.; YE, H.; ZHENG, R.; LI, J.; YANG, H.; YU, X.; ZHANG, D. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 31, n. 3, p. 315-21, 2009.

GUPTA, M.P.; ARIAS, T.D.; CORREA, M.; LAMBA, S.S. Ethnopharmacognostic observations on Panamanian medicinal plants. Part I. **Quarterly Journal of Crude Drug Research**, v.17, n.3-4, p.115-130, 1979

HARADA, S. The broad anti-viral agent glycyrrhizin directly modulates the fluidity of plasma membrane and HIV-1 envelope. **Biochemical Journal**, v.392, p. 191–199, 2005.

HART, P. H.; BRAND, C.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V.; PRAGER, R. H.; FINLAY-JONES J. J. Terpinen-4-ol, the main component of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil), suppresses inflammatory mediator production by activated human monocytes. **Inflammation Research**, v. 49, p. 619–626, 2000.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.67-202, 2002.

HAYNES, R. K. From artemisinin to new antimalarials: biosynthesis, extraction, old and new derivatives, stereochemistry and medicinal chemistry requirements. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.6, p. 509–537, 2006.

HEIM, K.E.; TAGLIAFERRO, A.R.; BOBILYA, D.J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **The Journal of nutritional biochemistry**, v.13, n.10, p.572-584, 2002.

HUIZING, M.T.; MISSER, V.H.S.; PIETERS, R.C., HUIJINK, W.W.T., VEENHOF, C.H.N.; VERMORKEN, J.B., PINEDO, H.M.; BEIJNEN, J.H. Taxanes: A New Class of Antitumor Agents. **Cancer Investigation**, v. 13, p.381-404, 1995.

HUNSKAAR, S.; BERGER, O.G; HOLE, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. **Pain**, v. 25, p. 125-132, 1986.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n.1, p. 69-76., 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v.30, p. 103-14, 1987.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, J. L.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n. 25, p. 2868-2885, 2007.

JESSEL, T.M.; KELLY, D.D. Pain and analgesia. In: KANDEL, E.R; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL T.M. **Principles of neural science**. 5 ed. New York: Elsevier, p. 385-399, 2012.

- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- KADIR, A.; AIZAN, N. A.; ABDUL MUTALIB, M.; RAHMAT, A. Comparison of antioxidant properties of tamarillo (*Cyphomandra betacea*), cherry tomato (*Solanum lycopersicum* var. cerasiform) and tomato (*Lycopersicon esulentum*). **International Food Research Journal**, v.21, n.6, p.2355-2362, 2014.
- KANATT, S. R.; LAHARE, P.; CHAWLA, S. P.; SHARMA, A. *Kappaphycus alvarezii*: Its antioxidant potential and use in bioactive packaging films. **The Journal of Microbiology, Biotechnology and Food Sciences**, v.5, n.1, p.1, 2015.
- KIM, H.P.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KANG, S. S. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v.96, n.3, p. 229-245, 2004.
- KIM, M. K.; YUN, K. J.; DA HAE LIM, J. K.; JANG, Y. P. Anti-Inflammatory Properties of Flavone di-C-Glycosides as Active Principles of *Camellia Mistletoe*, *Korthalsella japonica*. **Biomolecules & therapeutics**, v.24, n.6, p.630, 2016.
- KISSIN, I. The development of new analgesics over the past 50 years: a lack of real breakthrough drugs. **Anesthesia & Analgesia**, v. 110, n. 3, p. 780-789, 2010.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor (Pathophysiology of pain). **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, p. 1-12, 2008.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, n.1, p. 412-412, 1959.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and bioproducts processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.
- KUMBHARE, M.; SIVAKUMAR, T. Anti-Inflammatory and Analgesic Activity of Stem Bark of *Moringa Oleifera*. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 641-650, 2011.
- LALL, N.; KISHORE, N.J. Are plants used for skin care in South Africa fully explored? **Ethnopharmacology**, v.153, n.1, p.61-84, 2014.
- LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. L.; CASTRO, M. S. de A.; LIMA, T. M. de L. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5. ed. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais, p. 143, 2008.
- LAWRENCE, T.; GILROY, D.W. Chronic inflammation: a failure of resolution? **International Journal of Experimental Pathology**, v. 88, p. 85-94, 2007.
- LE BARS, D.; GOZARIU; M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.
- LEITÃO, G.G.; SANTOS EL-ADJI, S.; DE MELO, W.A.L., GUIMARÃES LEITÃO, S.; BROWN, L. Separation of free and glycosylated flavonoids from *Siparuna guianensis* by gradient and isocratic CCC. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v.28, n.12-13, p.2041-2051, 2005.

- LEITÃO, G.G.; SIMAS, N.K.; SOARES, S.S.; DE BRITO, A.P.P.; CLAROS, B.M.; BRITO, T.B.; DELLE MONACHE, F. Chemistry and pharmacology of Monimiaceae: a special focus on Siparuna and Mollinedia. **Journal of ethnopharmacology**, v.65, n.2, p.87-102, 1999.
- LIMA JR, J.F.; DIMENSTEIN, M.A. Fitoterapia na Saúde Pública em Natal/RN: visão do odontólogo. **Saúde Revista**, v. 8, p. 1937-1944, 2006.
- LIMA, G.M.; BONFIM, R.R.; SILVA, M.R.; THOMAZZI, S.M.; SANTOS, M.R. V.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; BONJARDIM, L.R.; ARAÚJO, A.A.S. Assessment of antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cass., Asteraceae, aqueous extract. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.21, n.3, p. 486-490, 2010.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R., Pain: an overview. **Lancet**, v. 353, n. 9164, p. 1607-1609, 1999.
- LOPES, L.S.; PEREIRA, S.S.; SILVA, L.L.; FIGUEIREDO, K.A.; MOURA, B.A.; ALMEIDA, F.R, SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effect of topiramate in models of acute pain and diabetic neuropathy in rodents. **Life sciences**, v.84, n.3, p. 105-110, 2009.
- LOPEZ, A.; HUDSON, J.B.; TOWERS, G.H.N. Antiviral and antimicrobial activities of Colombian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.77, n.2, p.189-196, 2001.
- LÓPEZ-POSADAS, R.; BALLESTER, I.; ABADÍA-MOLINA, A. C.; SUÁREZ, M. D.; ZARZUELO, A.; MARTÍNEZ-AUGUSTIN, O.; MEDINA, F. S. Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure-activity relationship study. **Biochemical Pharmacology**, v.76, n.4, p.495-506, 2008.
- LU, Y.; FOO, L. Y. Antioxidant and radical scavenging activities of polyphenols from apple pomace. **Food chemistry**, v.68, n.1, p.81-85, 2000.
- LUNA, J.S.; SANTOS, A.F.; LIMA, M.R.F.; OMENA, M.C.; MENDONÇA, F.A.C.; BIEBER, L.W.; SANT'ANA, A.E.G. A study of the larvicidal and molluscicidal activities of some medicinal plants from northeast Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 199-206, 2005.
- MACKENZIE, G. G.; DELFINO, J. M.; KEEN, C. L.; FRAGA, C. G.; OTEIZA, P. I. Dimeric procyanidins are inhibitors of NF- κ B–DNA binding. **Biochemical pharmacology**, v.78, n.9, p.1252-1262, 2009.
- MAHAT, M.Y.A.; KULKARNI, N.M.; VISHWAKARMA, S.L.; KHAN, F.R.; THIPPESWAMY, B.S.; HEBBALLI, V.; ADHYAPAK, A.A.; BENADE, V.S.; ASHFAQUE, S.M.; TUBACHI, S.; PATIL, B. M. (2010). Modulation of the cyclooxygenase pathway via inhibition of nitric oxide production contributes to the anti-inflammatory activity of Kaempferol. **European journal of pharmacology**, v.642, n.1, p.169-176, 2010.
- MARCO, G.J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v.45, n.9, p.594-598, 1968

MARRASSINI, C.; DAVICINO, R.; ACEVEDO, C.; ANESINI, C.; GORZALCZANY, S.; FERRARO, G. Vicenin-2, a potential anti-inflammatory constituent of *Urtica circularis*. **Journal of natural products**, v.74, n.6, p.1503-1507, 2011.

MARTINAZZO, A. P., C FILHO, L. C., ROSA, D. A., TEODORO, C. E. S., TOMAZELLI, K. K. Perfil de utilização de fitoterápicos nos municípios de volta Redonda e Barra Mansa/RJ. **Revista Fitos Eletrônica**, v.8, n.2, p. 103-112, 2015.

MARTÍNEZ, A. L.; GONZÁLEZ-TRUJANO, M. E.; AGUIRRE-HERNÁNDEZ, E.; MORENO, J.; SOTO-HERNÁNDEZ, M., LÓPEZ-MUÑOZ, F. J. Antinociceptive activity of *Tilia americana* var. mexicana inflorescences and quercetin in the formalin test and in an arthritic pain model in rats. **Neuropharmacology**, v.56, n.2, p.564-571, 2009.

MC CURDY, C.R.; SCULLY, S.S. Analgesic substances derived from natural products. **Life Sciences**, v. 78, p. 476-484, 2005.

MELO, D.; MIRANDA, M.; JUNIOR, W.; ALCOBA, A.; ANDRADE, P.; SILVA, T.D.S.; CAZAL, C.; MARTINS, C. (2017). Anticariogenic and Antimycobacterial Activities of the Essential Oil of *Siparuna guianensis* Aublet (Siparunaceae). **Orbital-The Electronic Journal of Chemistry**, v.9, n.1, p.55-60, 2017.

MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of Food Flavonoids by High Performance Liquid Chromatography: A. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n.3, 2000.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. **Classification of Chronic Pain**. 2 ed. Seattle: IASP Press, 1194.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v.52, n.4, p.673-751, 2000.

MILLAN, M.J. Descending Control of Pain. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 355-474, 2002.

MILLIKEN, W.; ALBERT, B. The use of medicinal plants by the Yanomami Indians of Brazil. **Economic Botany**, v.50, n.1, p.10-25, 1996.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-1043, 2012.

MONTANARI, R.M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenacea**. Tese (Pós Graduação em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

MOORE, N.D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain**, v. 11, n. 3, p. 129-137, 2009.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

- NEGRI, G., RODRIGUES, E. Essential oils found in the smoke of "tira-capeta", a cigarette used by some quilombolas living in pantanal wetlands of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3, p.310-316, 2010.
- NEGRI, G.; SANTI, D. D.; TABACH, R. Chemical composition of hydroethanolic extracts from *Siparuna guianensis*, medicinal plant used as anxiolytics in Amazon region. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.22, n.5, p.1024-1034, 2012.
- NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of natural products**, v.75, n.3, p.311-335, 2012.
- OLESEN, A.E; ANDRESSEN T.; STAAHL C.; DREWS A.M. Human experimental pain models for assessing the therapeutic efficacy of analgesic drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 64, p. 722-779, 2012.
- OUEDRAOGO, M.; BAUDOUX, T.; STÉVIGNY, C.; NORTIER, J.; COLET, J.M.; EFFERTH, T.; FAN QUF; ZHOG, J.; CHAN, K.; SHAW, D.; PELKONEN. O.; DUEZ, P. Review of current and "omics" methods for assessing the toxicity (genotoxicity, teratogenicity and nephrotoxicity) of herbal medicines and mushrooms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 3, p. 492-512, 2012.
- PADUCH, R.; KANDEFER-SZERSZEŃ, M.; TRYTEK, M.; FIEDUREK, J. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v.55, p. 315-327, 2007.
- PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M. K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y. H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinense* Turcz extracts and its major flavonoids, Kaempferol and Kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi**, v.127, n.8, p.1275-1279, 2007.
- PARVIN, N.; ANSARI SAMANI R.; SHAHINFARD N.; REISSI S.; ALIBABAIE Z.; ASGARI, A.A. Effect of alcoholic extract of *Tanacetum parthenium* on acute pain in rat. **The Journal of Qazvin University of Medical Sciences**, v. 16, n.1, p. 15-21, 2012.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução a espectroscopia**. 4 ed. São Paulo: CENGAGE Learning, 2010.
- PIMENTA, C.A.M.; TEIXEIRA, M.J.; SIMÕES, P.; SIMÕES, C.; CRUZ, D.A.L.M.; OKADA, M. Liga de dor: uma experiência de ensino extracurricular. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v.32, n.3, p. 281-289, 1998.
- PINHEIRO, B.; SILVA, A.; SOUZA, G.; FIGUEIREDO, J.; CUNHA, F.; LAHLOU, S.; DA SILVA, J.K.; MAIA, J.G.; SOUSA, P.J. Chemical composition, antinociceptive and anti-inflammatory effects in rodents of the essential oil of *Peperomia serpens* (Sw.) Loud. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 188, p. 479-486, 2011.
- PORTELLA, A. C. F.; MUNARO, M.; ASCÊNCIO, S. D.; SIQUEIRA, C. A.; FERREIRA, T. P. S.; AGUIAR, R. W. S. Caracterização físico-química do óleo essencial da *Siparuna guianensis* Aublet. **Quimica Nova**, v.37, n.5, p.844-849, 2014.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific

application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, 269: 337-341, 1999.

QUINTANS-JÚNIOR, L.; ROCHA, R.F.; CAREGNATO, F.F.; MOREIRA, J.C.F.; SILVA, F.A.; ARAÚJO, A.A.S.; SANTOS, J.P.A.; MELO, M.S.; SOUSA, D.P.; BONJARDIM, L.R.; GELAIN, D.P. Antinociceptive Action and Redox Properties of Citronellal, na Essential Oil Present in Lemongrass. **Journal of medicine food**, v. 14, p. 630-639, 2011.

RANG, H.P.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang e Dale - Farmacologia**. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

RAO, P.; KNAUS, E.E. Evolution of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs): cyclooxygenase (COX) inhibition and beyond. **Journal of Pharmacy & Pharmaceutical Sciences**, v. 11, n. 2, p. 81-110s, 2008.

RATES, S.M.K.; BARROS, H.M.T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 75, n. 2, p. 31-4, 1994.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Inflammation & Allergy)**, v.8, n.3, p.229-235, 2009.

RECIO, M.C; ANDUJAR, I.; RIOS, J.L. Anti-inflammatory agents from plants: progress and potential. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2088-2103, 2012.

RHO, H.S.; GHIMERAY, A.K.; YOO, D.S.; AHN, S.; M., KWON, S.S.; LEE, K.H.; CHO, J.Y.; CHO, J. Y. Kaempferol and Kaempferol ramnosídeos with depigmenting and anti-inflammatory properties. **Molecules**, v.16, n.4, p.3338-3344, 2011.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. **HOLOS**, v.1, 2015.

RODRIGUES, E.; ALMEIDA, J. M. D.; PIRES, J. M. Perfil farmacológico e fitoquímico de plantas indicadas pelos caboclos do Parque Nacional do Jaú (AM) como potenciais analgésicos: parte I. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n.6, p. 981-991, 2010.

ROSELAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MOEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v.42, n.2, p.235-242, 1990.

SANTOS, J. D. F. L.; PAGANI, E.; RAMOS, J.; RODRIGUES, E. Observations on the therapeutic practices of riverine communities of the Unini River, AM, Brazil. **Journal of ethnopharmacology**, v.142, n.2, p.503-515, 2012.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L. Anti-inflammatory activity and Bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneimittel-Forschung/Drug Research**, v. 32, p. 230-235, 1982.

- SERHAN, C.N.; SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v.6, p. 1191-1197, 2005.
- SERVAT, L. **Atividade antinociceptiva e anticâncer *in vitro* de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos das sementes de *Pterodon pubescens* Benth.** Dissertação (Mestrado em odontologia) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.
- SIMAS, N.K.; FERRARI, S.F.; PEREIRA, S.N.; LEITÃO, G.G. Chemical ecological characteristics of herbivory of *Siparuna guianensis* seeds by buffy-headed marmosets (*Callithrix flaviceps*) in the Atlantic forest of southeastern Brazil. **Journal of chemical ecology**, v.27, n.1, p.93-107, 2001.
- Siparuna* in FLORA DO BRASIL 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em 10 dez 2017.
- Siparuna guianensis* in THE PLANT LIST (2013). Version 1.1. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/>>. Acesso em 11 dez 2017.
- SOFFLER, C. Oxidative stress. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v.23, n.1, p.135-157, 2007.
- SONG, W.; DERITO, C.M.; LIU, M.K.; HE, X.; DONG, M.; LIU, R. H. Cellular antioxidant activity of common vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.11, p.6621-6629, 2010.
- SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v.579, n.1, p.200-213, 2005.
- SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best practice & research. Clinical gastroenterology**, v.24, n. 2, p. 121–132, 2010.
- SUCUPIRA, N.R.; SILVA, A.B.; PEREIRA, G.; COSTA, J.N. Methods for measuring antioxidant activity of fruits. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.14, n.4, p.263-269, 2012.
- TABASSUM, N.; HAMDANI, M. Plants used to treat skin diseases. **Pharmacognosy Reviews**, v.8, n.15, p.52-60, 2014.
- TAREAU, M. A.; PALISSE, M.; ODONNE, G. As vivid as a weed... Medicinal and cosmetic plant uses amongst the urban youth in French Guiana. **Journal of Ethnopharmacology**, v.203, p.200-213, 2017.
- TEMPONE, A.G.; BORBOREMA, S.T.; DE ANDRADE, H.F.; DE AMORIM GUALDA, N.C.; YOGI, A.; CARVALHO, C. S.; BACHIEGA, D.; LUPO, F.N.; BONOTTO, S.V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v.12, n.5, p.382-390, 2005.

- THOMÉ, R.G.; SANTOS, H.B D.; SANTOS, F.V.D.; OLIVEIRA, R.J.D.S.; DE CAMARGOS, L. F.; PEREIRA, M. N.; LONGATTI, T.R.; SOUTO, C.M; FRANCO, C.S.; SCHUFFNER, O.A.; RIBEIRO, R.I.M.A. Evaluation of healing wound and genotoxicity potentials from extracts hydroalcoholic of *Plantago major* and *Siparuna guianensis*. **Experimental Biology and Medicine**, v.237, n.12, p.1379-1386, 2012.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n.1, p. 5-17, 1992.
- TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Popular phytotherapy: the instrumental search as therapy. **Texto & Contexto-Enfermagem**, v. 15, n. 1, p. 115-121, 2006.
- TORRICO, F.; CEDEÑO, P.; GUEVARA, A.; COMPAGNONE, R. S.; SUÁREZ, A. I. Acute Toxicity and Evaluation of the Antinociceptive Activity of *Amanoa almerindae* Leaf Aqueous Extract in Experimental Animals. International. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research**, v. 1, n. 5, p. 165-169, 2013.
- UEDA, H., YAMAZAKI, C., YAMAZAKI, M. A hydroxyl group of flavonoids affects oral anti-inflammatory activity and inhibition of systemic tumor necrosis factor- α production. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v.68, n.1, p.119-125, 2004.
- UGWAH-OGUEJIOFOR, C. J.; BELLO, S. O.; ETUK, E. U.; IGBOKWE, V. U.; UGWAH, O. M.; OKOLO, R. U. Preliminary toxicity and phytochemical studies of the aqueous extract of *Ficus platyphylla* in female albino rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.1, n.5, 2011.
- UMA DEVI, P.; GANASOUNDARI, A.; VRINDA, B.; SRINIVASAN, K.K.; UNNIKRISHNAN, M.K. Radiation protection by the ocimum flavonoids orientin and vicenin: mechanisms of action. **Radiation Research**, v.154, n.4, p.455-460, 2000.
- VALENTINI^a, C.M.A.; SILVA, L.E.; MACIEL, E.N.; FRANCESCHINI, E.; SOUSA JR, P.T.; DALL'OGGIO, E.L.; COELHO, M.D.F.B. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, v.33, p.1506-1509, 2010.
- VALENTINI^b, C.M.A.; RODRÍGUEZ-ORTÍZ, C.E.; COELHO, M.F.B. (2010). *Siparuna guianensis* Aublet ("negramina"): a review. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.12, n.1, p.96-104, 2010.
- VAN ANDEL, T.; DE KORTE, S.; KOOPMANS, D.; BEHARI-RAMDAS, J.; RUYSSCHAERT, S. Dry sex in Suriname. **Journal of ethnopharmacology**, v. 116, n.1, p.84-88, 2008.
- VAN'T KLOOSTER, C.; VAN ANDEL, T.; REIS, R. Patterns in medicinal plant knowledge and use in a Maroon village in Suriname. **Journal of ethnopharmacology**, v.189, p.319-330, 2016.
- VERGNOLLE, N. Post inflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Neurogastroenterology & Motility**, v. 20, n. s1, p. 73-80, 2008.

- WHITE, B. A. The use of changes in capillary in mice to distinguish between narcotic and non-narcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 22, p. 246-253, 1964.
- WHITEHOUSE, M.W. Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: Reflections after 60 years. **Inflammopharmacology**, v. 19, p. 1–19, 2011.
- WOJTUNIK, K.A.; CIESLA, L.M.; WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M. Model studies on the antioxidant activity of common terpenoid constituents of essential oils by means of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.62, n.37, p.9088-9094, 2014.
- XU, J.; ZHAO, Q.; WEI, L.; YANG, Y.; XU, R.; YU, N.; ZHAO, Y. Phytochemical Composition and Antinociceptive Activity of *Bauhinia glauca* subsp. *hupehana* in Rats. **PloS one**, v.10, n.2, p.e0117801, 2015.
- YADAV, Manila; YADAV, Amita; YADAV, Jaya Parkash. *In vitro* antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific journal of tropical medicine**, v.7, p. S256-S261, 2014.
- YAQEEEN, Z.; NAQVI, N.H.; IMRAN, H.; FATIMA, N.; SOHAIL, T.; REHMAN, Z.; RAHMAN, A. Evaluation of analgesic activity of *P. domestica* L. *Pak. Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.26, p.94-99, 2013.
- YAZBEK, P. B.; TEZOTO, J.; CASSAS, F.; RODRIGUES, E. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. **Journal of ethnopharmacology**, v.179, p.310-331, 2016.
- YIN, H.; XU, L.; PORTER, N.A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical reviews**, v.111, n.10, p.5944-5972, 2011.
- YIN, Z. Y.; LI, L.; CHU, S. S.; SUN, Q.; MA, Z. L.; GU, X. P. Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. **Scientific reports**, v. 6, p. 27129, 2016.
- YOUNG, C. P.; GERALD, R.; CLAUDE, S.; GIUSEPPE, V.; Lester, P. Activity of monomeric, dimeric, and trimeric flavonoids on NO production, TNF-secretion, and NF-kappaB-dependent gene expression in RAW 264.7 macrophages. **FEBS Letters**, v.465, p.93-97, 2000.
- ZEKOVIĆ, Z.; PAVLIĆ, B.; CVETANOVIĆ, A.; ĐUROVIĆ, S. Supercritical fluid extraction of coriander seeds: Process optimization, chemical profile and antioxidant activity of lipid extracts. **Industrial Crops and Products**, v.94, p.353-362, 2016.
- ZHANG, R.; REN, K. Animal models of inflammatory pain. In: **Animal Models of Pain**. Humana Press, 2011. p. 23-40.
- ZIEGLGANSBERGER, W.; BERTHELE, A.; TOLLE, T.R. Understanding neuropathic pain. **CNS Spectrums**, v. 10, n. 4, p. 289-308, 2005.
- ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, p. 543-540, 1998.

ZOU, Y.; CHANG, S.K.C; GU, Y.; QIAN, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. Morton) extract and its fractions. **Journal of Agricultural and food chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2268, 2011.