



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO TOXICOFARMACOLÓGICA DE
Aspidosperma pyrifolium Mart.**

(APOCYNACEAE)

CAMPINA GRANDE-PB

SETEMBRO/2016

FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

**CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO TOXICOFARMACOLÓGICA DE
Aspidosperma pyrifolium Mart.**

(APOCYNACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção de título de Mestre.

Linha de pesquisa: Obtenção e avaliação da atividade biológica de produtos naturais e sintéticos de interesse farmacêutico.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Harley da Silva Alves

CO-ORIENTADORA: Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos

CAMPINA GRANDE-PB

SETEMBRO/2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

L759c Lins, Francisca Sabrina Vieira.
Constituintes químicos e avaliação toxicofarmacológica de
Aspidosperma pyrifolium Mart. (apocynaceae) [manuscrito] /
Francisca Sabrina Vieira Lins. - 2016.
152 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação
e Pesquisa, 2016.
"Orientação: Profa. Dra. Harley da Silva Alves,
Departamento de Farmácia".
"Co-Orientação: Profa. Dra. Vanda Lúcia dos Santos,
Departamento de Farmácia".
1. *Aspidosperma pyrifolium* Mart. 2. Pereiro. 3.
Fitoquímica. 4. Plantas medicinais. 5. Inflamação. I. Título.
21. ed. CDD 615.321

FRANCISCA SABRINA VIEIRA LINS

CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO TOXICOFARMACOLÓGICA
DE *Aspidosperma pyriforme* Mart.

(APOCYNACEAE)

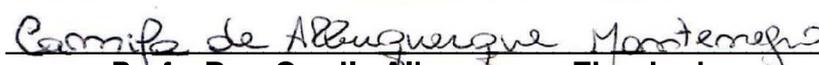
Aprovada em 31/08/2016

Dissertação apresentada à Universidade Estadual da Paraíba, em cumprimento dos requisitos exigidos pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, para a obtenção de título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Harley da Silva Alves – UEPB
Orientador



Profa. Dra. Camila Albuquerque Figueiredo
Examinadora interna - UEPB



Prof. Dr. Josean Fchine Tavares
Examinador externo - UFPB

AGRADECIMENTOS

Agradeço em primeiro lugar à Deus, pai de bondade, por manter-me firme na direção do meu sonho.

Aos meus pais, Francisca Ernalda Vieira Lins e Sebastião Vieira Lins, a base de tudo que sou hoje.

À minha irmã Samara Vieira Lins, por ser sempre meu exemplo de dedicação à profissão.

À minha sobrinha Maria Cecília, por alegrar os meus dias.

Ao meu namorado Tiago Jácome, pelo cuidado, amor e paciência, principalmente durante a fase de conclusão.

Ao meu orientador, professor Harley da Silva Alves e à minha co-orientadora, professora Vanda Lúcia dos Santos, por aceitarem o convite de me acompanhar e por seus ensinamentos ao longo desses 30 meses.

À banca examinadora, pelo convite em participar das correções desde estudo.

À minha orientadora de graduação, professora Danielly Albuquerque, da Universidade Federal de Campina Grande, pelo apoio durante o processo seletivo para ingresso nesta pós-graduação.

À todos os professores da pós-graduação de Ciências Farmacêuticas, que de alguma forma colaboraram para a realização desta pesquisa.

À todos que fazem parte do Laboratório de Fitoquímica e do Laboratório de Ensaios Farmacológicos da Universidade Estadual de Campina Grande, pela atenção e dedicação à este trabalho.

Ao médico veterinário Armando Nunes, pelo incentivo e ajuda durante o início da pesquisa.

Às minhas amigas, companheiras de graduação e apartamento: Maria Luíza Silva, Áurea Marcela de Souza e Fernanda Ílary, pois é impossível enumerar o que fizeram e fazem por mim até os dias atuais, são irmãs de coração.

À todos os meus amigos e parentes, que torcem pela concretização dos meus sonhos.

“Tudo posso n’aquele que me fortalece!”

(Felipenses 4:13)

LINS, F. S. V. **CONSTITUINTES QUÍMICOS E AVALIAÇÃO TOXICOFARMACOLÓGICA DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (APOCYNACEAE)**. Campina Grande, PB: UEPB, 2016 (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

RESUMO

Aspidosperma pyrifolium Mart. é uma planta da família Apocynaceae, conhecida como pereiro, pau-pereiro, pereiro-vermelho, pau-de-coaru. Tem larga dispersão em toda a zona da caatinga e na medicina tradicional é utilizada no tratamento de distúrbios respiratórios e febre. O estudo teve como objetivo realizar o isolamento e a identificação dos constituintes químicos da fase hexânica e da fração de alcaloides totais (FAT-Ap) (provenientes do extrato etanólico bruto das cascas do caule) por técnicas cromatográficas e espectroscópicas (espectroscopia no Infravermelho e espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear) bem como testes farmacológicos (através de modelos de inflamação e analgesia) e de toxicidade aguda, da fração de alcaloides totais (FAT-Ap). Desta forma, foram isolados pela primeira vez no gênero *Aspidosperma*, os compostos paristina (antraquinona) e liquexantona (xantona), da fase hexânica. Foram isolados também pela primeira vez nesta espécie os triterpenos lupeol e β -amirina, retirados da fase hexânica. Ainda no estudo fitoquímico, a FAT-Ap foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência, o que permitiu o isolamento e identificação de dois alcaloides indólicos monoterpênicos de núcleo plumerano (15-metoxipirifolidina e 15-metoxiaspidospermina. Para avaliar o potencial anti-inflamatório foram realizados teste de edema de pata e teste de peritonite, ambos induzidos por carragenina. Já para avaliar a atividade anti-nociceptiva optou-se pelos modelos de nocicepção induzida por formalina e teste de contorções abdominais induzida por ácido acético. Quanto aos resultados farmacológicos, a FAT-Ap apresentou potencial tanto anti-inflamatório quanto analgésico, atingindo até 85,57% de inibição (na dose de 30 mg/kg) das contorções induzidas por ácido acético, frente aos modelos animais. Deste modo, tal espécie mostrou-se fonte promissora de substâncias com potencial terapêutico. Todavia, ressalva-se o cuidado para a toxicidade apresentada (DL_{50} = 160 mg/kg), sendo assim seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

Palavras-chave: *Aspidosperma pyrifolium* Mart., fitoquímica, inflamação, analgesia, toxicidade aguda.

LINS, F. S. V. **CHEMICAL CONSTITUENTS AND TOXIC DRUG EVALUATION OF *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (APOCYNACEAE)**. Campina Grande, PB: UEPB, 2016 (Dissertation in Pharmaceutical Sciences).

ABSTRACT

Aspidosperma pyrifolium Mart. Apocynaceae is a family plant, known as pereiro, stick pereiro, pereiro-red, stick-to-coaru. It has wide spread throughout the area of savanna and in traditional medicine is used to treat respiratory disorders and fever. The study aimed to carry out the isolation and identification of the chemical constituents of hexânica phase and the fraction of total alkaloids (FAT-Ap) (from the ethanol extract of the stem bark) by chromatographic and spectroscopic techniques (infrared spectroscopy and spectroscopic Nuclear Magnetic resonance of) and pharmacological tests (by inflammation and analgesic models) and acute toxicity, the fraction of total alkaloids (FAT-Ap). Thus, were isolated for the first time in *Aspidosperma* Genro, the paristina compounds (anthraquinone) and liquexantona (xanthone), the hexane phase. Also they were isolated for the first time in this species the triterpenes lupeol and β -amyryn, removed the hexane phase. Although the phytochemical study, the FAT-Ap was subjected to high-performance liquid chromatography, which allowed the isolation and identification of two indole alkaloids monoterpeneoid of plumerano core (15 metoxipirifolidina and 15 metoxiaspidospermina. To evaluate the anti-inflammatory potential were performed paw edema test and test peritonitis, both induced by carrageenan. As for evaluating the anti-nociceptive activity was chosen for nociception models of formalin induced writhing test induced by acetic acid. As for the pharmacological results, the FAT-Ap showed anti-inflammatory potential both as analgesic, reaching up to 85.57% inhibition (at 30 mg / kg) of writhes induced by acetic acid, versus animal models. Thus, this kind has proved promising source of substances with therapeutic potential. However, care is presented for the reservation-toxicity (LD50 = 160 mg / kg), thus conditioning its use for the determination of safe doses.

Keywords: *Aspidosperma pyrifolium* Mart, phytochemical, acute toxicity, triterpenoids, inflammation, analgesia acute toxicity.

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

CE₅₀ – concentração efetiva média

CEUA – Comitê de Ética em Uso de animais

CI₅₀ – concentração inibitória média

COX – cicloxigenase

d.p. – Desvio-padrão

DL₅₀ – concentração letal média

EEB – extrato etanólico bruto

FAT-Ap – Fração de alcaloides totais de *Aspidosperma pyrifolium* Mat.

IL – interleucina

IV - Infravermelho

LT – leucotrienos

OMS – Organização Mundial de Saúde

PBS – tampão fosfato

PG- prostaglandina

PGI - prostaciclina

pH – Potencial hidrogeniônico

RMN – Ressonância magnética nuclear

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – fator de necrose tumoral

TRV1 – Receptores Vaniloides tipo 1

Tx – tromboxanos

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Sistema Gradiente utilizado para separação dos picos da FAT-Ap em CLAE preparativo 83
- Tabela 2:** Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto paristina (F20) proveniente da fase hexânica em comparação com dados da literatura da mesma substância já isolada 90
- Tabela 3:** Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto liquexantona (F20) 91
- Tabela 4** – Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto lupeol de (F26) 104
- Tabela 5** - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto β -amirinas (F26) 105
- Tabela 6** - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 15-metoxipirifolidina (R3). 115
- Tabela 7** - Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto 15-metoxiaspidospermina (R3) 116
- Tabela 8** - Efeito da administração oral da FAT-Ap na evolução ponderal (alteração da massa corpórea) e no consumo de água e ração em camundongos Swis durante 14 dias. 135
- Tabela 9** - Efeito da administração oral da FAT-Ap sobre o peso relativo dos órgãos ao final do experimento. 136
- Tabela 10** - Efeito anti-inflamatório da FAT-Ap. sobre a espessura da pata (milímetros) até a quarta hora após a indução da inflamação por carragenina 1%. 139
- Tabela 11-** Efeito antiquimiotático da FAT-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos após peritonite induzida por carragenina 1%. 142
- Tabela 12-** Efeito antinociceptivo da FAT-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. 143
- Tabela 13** – Efeito antinociceptivo da FAT-Ap nas fases I (0-5 minutos) e II (15-30 minutos) após nocicepção induzida por formalina 1%. 145

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 – Origem dos metabólitos secundários de plantas	40
Fluxograma 2 – Processamento das cascas do caule até obtenção das fases de <i>A. pyrifolium</i> Mart.	78
Fluxograma 3 – Cromatografia em coluna (CC) das frações F 20 e 26 da fase hexânica	79
Fluxograma 4 – Obtenção da fração de alcaloides totais (FAT-Ap)	80
Fluxograma 5 – Cromatografia em coluna de média pressão da FAT-Ap	82
Fluxograma 6 – Obtenção da fração R3 da FAT-Ap em CLAE preparativo	84

LISTA DE FIGURAS:

Figura 1 – Mapa do Brasil e seus respectivos biomas	24
Figura 2 – Vegetação típica do Bioma caatinga	25
Figura 3 – Estrutura química do alcaloide indólico aspidospermina	26
Figura 4 – Planta adulta do pereiro	30
Figura 5 – Frutos do pereiro	31
Figura 6 – A-E) <i>Aspidosperma pyrifolium</i> . A e B) Árvores. C) Flor. D e E) Vagens. F) Feto de ovelha intoxicada por <i>A. pyrifolium</i>	37
Figura 7 – Estrutura química dos compostos fundamentais das principais famílias de triterpenos	42
Figura 8 – Estrutura química do triterpeno lupeol	44
Figura 9 – Estrutura química dos triterpenos α e β amirinas	45
Figura 10 – Alcaloides de raízes, folhas e cascas do caule	47
Figura 11 – Alcaloides de importância social e econômica	47
Figura 12 – Alcaloides de importância histórica	48
Figura 13 - Alcaloides indólicos simples	49
Figura 14 – Reação de obtenção de strictosidina	49
Figura 15 - Esquema de reações de cadeia monoterpênica	50
Figura 16 – Esqueletos básicos dos alcaloides indólicos monoterpênicos	51
Figura 17 – Sequência de eventos leucocitários	53
Figura 18 – Geração de metabólitos do ácido aracônico e seus papéis na inflamação	54
Figura 19 – Visão geral do mecanismo da dor	58
Figura 20 – Transmissão nervosa ascendente	59
Figura 21 – Reação positiva para presença de alcaloides	81
Figura 22 – Cromatograma de R3 obtido por CLAE preparativa (fase móvel solução aquosa a 0,2% de ácido trifluoroacético (TFA) : acetonitrila (77:23 à 65:35), com fluxo de 10 mL/min em um tempo de 15 minutos, modo gradiente	86
Figura 23 – Massas correspondentes aos picos de R3 (CLAE-MS-DAD-ESI) em fase móvel [solução aquosa a 0,2% de ácido trifluoroacético (TFA) : acetonitrila (77:23 à 65:35)], com fluxo de 10 mL/min, tempo de 15 minutos, modo gradiente	86
Figura 24 – Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilhas de KBr) de F20	92

Figura 25 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração F20.	92
Figura 26 –Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	93
Figura 27 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	93
Figura 28 – Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	94
Figura 29 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	94
Figura 30 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	95
Figura 31 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	95
Figura 32 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	96
Figura 33 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20	96
Figura 34 – Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração F20	97
Figura 35 – Mapa de contorno HSQS da fração 20	97
Figura 36 - Mapa de contorno HMBC da fração 20	98
Figura 37 - Fórmula estrutura do composto paristina (antraquinona)	88
Figura 38 - Fórmula estrutura do composto liquexantona (xantona)	89
Figura 39 - Mapa de contorno COSY da fração 20	98
Figura 40 - Mapa de contorno NOESY da fração 20	99
Figura 41 - Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilhas de KBr) de F26	106
Figura 42 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração F26	107
Figura 43 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	107
Figura 44 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	108
Figura 45 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	108
Figura 46 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	109
Figura 47 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	109
Figura 48 – Estrutura do lupeol	100
Figura 49 – Estrutura da β -amirina	100
Figura 50 – Estrutura da α -amirina	101
Figura 51 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração F26	110
Figura 52 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26	110
Figura 53 - Estrutura do lupeol	101
Figura 54 - Estrutura da β -amirina	102
Figura 55 - Estrutura da β -amirina	102
Figura 56 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) da fração R3	117

Figura 57- Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração R3	117
Figura 58 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração R3	118
Figura 59 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração R3	118
Figura 60 - Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração R3	119
Figura 61 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) da fração R3	119
Figura 62 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) expandido da fração FR3	120
Figura 63 - Espectro de RMN ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) expandido da fração FR3	120
Figura 64 – Mapa de Contorno HSQC da fração R3	121
Figura 65 - Mapa de Contorno HMBC da fração R3	121
Figura 66 – alcaloide 15-metoxipirifolidina isolado de R3	113
Figura 67 – alcaloide 15- metoxiaspidospermina isolado de R3	114
Figura 68 – Mapa de Contorno COSY de R3	122
Figura 69 - Mapa de Contorno NOESY de R3	122
Figura 70 – Medição da espessura da pata durante o experimento	130
Figura 71 – Injeção subplantar de formalina 1 % em camundongos	132
Figura 72 – Teste de formalina em camundongos <i>swis</i>	132
Figura 73 – Avaliação do efeito anti-inflamatório da FAT-Ap em função do tempo decorrido após indução de edema de pata por carragenina 1 %	140
Figura 74 – Comparação entre os pesos das patas direitas (que receberam carragenina 1%) ao final do experimento	141
Figura 75 – Injeção intraperitoneal de carragenina em camundongos	142
Figura 76 – Teste de formalina em camundongos	144

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	18
2.1. Objetivo geral	18
2.2. Objetivos Específicos	18
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	19
3.1. Plantas medicinais: Uma abordagem histórica	19
3.2. Plantas Medicinais no Brasil	20
3.3. Importância do estudo fitoquímico de plantas medicinais	23
3.4. O Bioma Caatinga	24
3.5. Família Apocynaceae	25
3.6. O gênero <i>Aspidosperma</i>	27
3.7. <i>Aspydosperma pyrifolium</i> Mart.	29
3.8. Propriedades tóxicas de <i>Aspydosperma pyrifolium</i> Mart.	35
3.9. Metabólitos secundários obtidos a partir de plantas	38
3.9.1. Terpenos	41
3.9.1.1. lupeol	43
3.9.1.2. α e β amirinas	44
3.9.2. Alcaloides: ocorrência, importância social e econômica	45
3.9.3. Alcaloides de maior prevalência na espécie <i>Aspydosperma pyrifolium</i> Mart.	48
3.9.4. Alcaloides indólicos	48
3.9.4.1. Alcaloides indólicos simples	48
3.9.4.2. Alcaloides indólicos monoterpênicos	49
3.10. O processo inflamatório	51
3.11. Fisiopatologia da dor	56
3.11.1. Mediadores da dor	60
3.12. O uso de modelos animais como ferramentas nas pesquisas de novos fármacos	60
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 1. CONSTITUINTES QUÍMICOS DE <i>Aspidosperma</i>	75

pyrifolium Mart.

1. INTRODUÇÃO	75
2. MATERIAL E MÉTODOS	76
2.1. Local da pesquisa	76
2.2. Material botânico	76
2.3. Preparo do extrato etanólico bruto	77
2.4. Partição do Extrato etanólico bruto (EEB-Ap)	77
2.5. Cromatografia em Coluna (CC) da fase hexânica	77
2.6. Obtenção da FAT-Ap	79
2.7. Cromatografia em Coluna (CC) da FAT-Ap	81
2.8 - Cromatografia Líquida de Alta eficiência	81
2.9. Análise espectroscópica no IV	84
2.10. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear	84
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	85
3.1. Dados Cromatográficos	85
3.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência	85
3.2. Dados espectroscópicos	87
4. CONCLUSÕES	123
REFERÊNCIAS	124
CAPÍTULO 2. ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-NOCICEPTIVA E TOXICOLÓGICA DE <i>Aspidosperma pyrifolium</i> Mart. (APOCYNACEAE) EM CAMUNDONGOS.	126
1. INTRODUÇÃO	126
2. MATERIAL E MÉTODOS	127
2.1. Local da pesquisa	127
2.2. Espécie e material botânico	127
2.3. Obtenção do extrato bruto	127
2.3.1 Marcha para obtenção da fração de alcaloides totais (FAT-Ap)	128
2.4. Animais	128
2.5. Avaliação da Toxicidade	128
2.5.1. Teste de toxicidade aguda	128
2.6. Ensaios Farmacológicos	129
2.6.1. Avaliação da resposta anti-inflamatória	129

2.6.1.1. Edema de pata induzido por carragenina	129
2.5.1.2. Peritonite induzida por carragenina	129
2.6.2. Avaliação da atividade anti-nociceptiva	131
2.5.2.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético	131
2.5.2.2. Nocicepção induzida por formalina	131
2.7. Análise estatística	132
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	133
3.1. Ensaio de Toxicidade Aguda	133
3.2. Ensaio Farmacológicos	138
3.2.1. Atividade anti-inflamatória	138
3.2.2. Atividade anti-nociceptiva	143
4. CONCLUSÃO	147
REFERÊNCIAS	148
ANEXO 1 Parecer do Comitê de ética em pesquisa com animais	152

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o tratamento de doenças que afligem o homem e os animais é uma prática realizada desde os primórdios da existência humana. Isso se deve tanto ao fato de que essas plantas em sua maioria possuem uma fácil obtenção, assim como à forte tradição popular existente em nosso meio. Outro ponto bastante relevante que justifica o uso de plantas com fins terapêuticos são as diversas dificuldades que impedem o acesso à farmacoterapia sugerida pela medicina moderna, que vai desde o diagnóstico até a obtenção de medicamentos industrializados, principalmente pelas populações existentes nas regiões mais pobres do país (VEIGA JUNIOR, PINTO e MACIEL, 2005).

Segundo BRAZ-FILHO (1994, p. 406): “a grande maioria das populações de países em desenvolvimento, ainda faz o uso de plantas medicinais como única forma de tratamento para suas enfermidades”. O uso dessas plantas é bastante disseminado por meio de raizeiros e curandeiros, sendo cultivadas principalmente por famílias residentes nas zonas rurais e preparadas em sua maioria na forma de lambedores e chás (XAVIER et al., 2011).

Na área farmacêutica, as plantas e os extratos vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas como protótipos para o desenvolvimento de medicamentos (XAVIER et al., 2011).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SILVA et al., 2010). Quanto aos estudos farmacológicos, além de constituírem um campo inesgotável de novos conhecimentos científicos e geradores de riquezas, podem contribuir notavelmente para a consolidação/comprovação da medicina tradicional (SIXEL e PECINALLI, 2005).

O êxito da pesquisa na química de produtos naturais depende do grau de interação de um grupo de pesquisa multidisciplinar nos quais fitoquímicos, botânicos sistemáticos, farmacologistas, toxicologistas, bioquímicos, médicos e microbiologistas, responsáveis pela avaliação biológica dos extratos, frações e compostos isolados das plantas, corroboram na tentativa de validar plantas medicinais, propiciando o conhecimento real da diversidade química, visando a obtenção de novos agentes com potencial terapêutico (BITTENCOURT, 2003).

A flora brasileira é considerada uma das mais ricas do mundo, com mais de 56.000 espécies, representando cerca de 19% da flora mundial. O Brasil também é o país com a

maior diversidade biológica do planeta, com alto índice de espécies endêmicas. Essa diversidade biológica é muito expressiva tanto em relação às potencialidades genéticas como em relação ao número de espécies e de ecossistemas (BRASIL, 2006).

A família Apocynaceae possui cerca de 200 gêneros e 2000 espécies, de distribuição tropical e subtropical, podendo chegar até regiões temperadas. O gênero *Aspidosperma* Mart. ocorre desde o México até a Argentina e distingue-se pela ocorrência de alcaloides indólicos. Toda a planta é bastante amarga, o que pode ser atribuído a esses alcaloides. Esse amargor até certo ponto, facilita seu conhecimento, mesmo quando totalmente desfolhada ou sem folhas ou frutos. É atribuída aos alcaloides indólicos de espécies desse gênero, uma larga aplicação terapêutica (BOURDY et al., 2004). Este fato tem despertado nos pesquisadores, a necessidade de uma investigação mais apurada de uma correlação entre as atividades terapêuticas, com a grande identificação de tais substâncias na planta.

No Brasil, *Aspidosperma pyrifolium* Mart., ocorre principalmente na caatinga nordestina e é conhecida como pereiro, pau-de-coaru e pequiá-da-mata (NÓBREGA, 2008). É uma árvore de porte regular, podendo atingir em média 5 m de altura (BRAGA, 1976).

Na medicina tradicional é utilizada por suas propriedades anti-inflamatória e analgésica, bem como para o tratamento de dores no estômago (por seu provável efeito relaxante sobre a musculatura lisa), distúrbios respiratórios, cólicas, êmese, febre, problemas cardíacos, urinários, dermatológicos, assim como, antidesintérica, bactericida, antisséptica e no tratamento de problemas do fígado, sob a forma de macerato (casca) ou decocto (casca). Possui dentre seus fitoconstituintes alcaloides, taninos, compostos fenólicos, flavonoides, xantonas, entre outros (RODRIGUES, 2015; SANTOS, 2010).

A ampla distribuição dessa espécie na região Nordeste, bem como suas respectivas atividades anti-inflamatória e analgésica disseminadas na medicina popular, motivou a realização de um estudo fitoquímico e farmacológico sobre quais substâncias encontradas nessa planta são capazes de promover tais efeitos farmacológicos.

2.OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral:

Isolar e identificar os constituintes químicos da fase hexânica e da fração de alcaloides totais (FAT-Ap), provenientes da cascas do caule, bem como avaliar as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e a toxicidade aguda da fração de alcaloides totais (FAT-Ap) de *Aspidosperma pyriformium* Mart. (Apocynaceae).

2.2. Objetivos Específicos:

- Fazer uma revisão bibliográfica sobre a espécie a ser trabalhada;
- Realizar a coleta, secagem e pulverização do material vegetal;
- Preparar o extrato etanólico bruto (EEB-Ap.);
- Realizar uma partição a partir do EEB-Ap., para obtenção das fases;
- Isolar a fração de alcaloides totais (FAT-Ap) a partir do EEB;
- Promover o isolamento dos compostos presentes na fase hexânica e na FAT-Ap. por meio de técnicas cromatográficas;
- Determinar as estruturas das substâncias isoladas por técnicas de espectroscopia na região do infravermelho, espectroscopia de massa, ressonância magnética nuclear ^1H e ^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais;
- Realizar teste de toxicidade aguda da fração de alcaloides totais (FAT-Ap) em animais para determinação da DL_{50} , bem como analisar outros parâmetros que indiquem toxicidade frente às doses utilizadas;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória da fração de alcaloides totais (FAT-Ap) em animais a partir de ensaios de edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida por carragenina;
- Avaliar atividade analgésica da fração de alcaloides totais (FAT-Ap) em animais a partir de ensaios de nocicepção induzida por formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Plantas Medicinais: Uma abordagem Histórica:

O uso de plantas como medicamentos vem desde o início da história humana. Registros das antigas civilizações evidenciam a engenhosidade do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma grande variedade de doenças (PHILLIPS, LÉON e BORONAT, 2008).

De acordo com Newman et al., (2000), manuscritos datados de 2600 a.C., encontrados na Mesopotâmia, relatam o uso de grande variedade de substâncias obtidas de plantas para o tratamento de diversas doenças, destacando-se os óleos extraídos das espécies de *Cedrus*, *Comminphora* e de *Papaver*. Outras grandes civilizações deixaram documentos que relatam o uso de diversas plantas medicinais, como o Papiro de Ebersum, documento Egípcio (1500 a.C.) e “Matéria Médica”, documento Chinês (1100 a.C). Ademais, dentro desse contexto histórico, dois personagens gregos se destacam: Theophrastus (300 a.C) – com sua “História das Plantas”, onde relata as qualidades de ervas medicinais – e Dioscorides (100 d.C) – que registrava devidamente a coleta, o armazenamento e o uso de plantas medicinais durante suas viagens com o exército romano.

Paracelso (físico suíço) no início do século XVI, começou a praticar a extração de substâncias a partir de drogas até então consideradas como indispensáveis, as quais denominou de “Quinta Essentia”, que é provavelmente a primeira noção de princípio bioativo (ALMEIDA, 2011).

No início do século XVII, houve uma compilação de todos os registros históricos sobre o uso de plantas medicinais, dando origem à publicação da Farmacopeia Londrina, um acervo que se encontra no Reino Unido (NEWMAN et al., 2000).

No final do século XVIII, tornou-se viável uma proposta científica sólida para o uso de fitofármacos, a partir do isolamento e estudo de metabólitos especiais. As primeiras substâncias químicas foram isoladas de extratos vegetais quando os ácidos orgânicos: oxálico, málico e tartárico foram separados e identificados. No início do século XIX, várias foram as substâncias bioativas isoladas, tais como: morfina do ópio; estriçnina de *Strychnus nux-vomica*; quinina de *Cinchona*; cafeína de *Coffea*. Os primeiros heterosídeos: salicina e digitalina, ainda foram descobertos nesse século, datando um novo aspecto do estudo de plantas medicinais, através do desenvolvimento da fisiologia e da farmacologia experimental (GEISSMAN e CROUT, 1969).

Em 1809, foram descritos os primeiros trabalhos sobre os efeitos tóxicos de *Strychnus* em animais de laboratório. Entretanto, é atribuído a Claude Bernard o mérito de estudar através de ensaios de laboratório com animais, a atividade de plantas indicadas empiricamente para fins medicinais e usadas na medicina popular, definindo sua forma de ação sistêmica. Nessas análises experimentais, iniciaram-se testes com substâncias bioativas, isoladas de extratos vegetais, iniciando uma nova visão de aplicação terapêutica. Sendo assim, pode-se sugerir que etnomedicina, farmacologia e química de produtos naturais caminham juntas desde o início do século XIX, tendo através do desenvolvimento científico, sofrido diferenciações e especialização a partir de uma ciência única, a “matéria médica”. Dessa forma, adquiriu características próprias (AKERELE, 1998).

A partir do século XX, os pesquisadores de áreas afins intensificaram a valorização de ações multidisciplinares e multiprofissionais como prioridade para o estudo científico na busca racional de princípios bioativos e ao final desse século a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu a importância do uso de plantas medicinais pela população mundial e integrou a medicina tradicional ao seu Programa Internacional de Saúde (ALMEIDA, 2011).

Desde então, planta medicinal foi definida como sendo qualquer planta que de alguma maneira seja utilizada no tratamento de alguma doença ou sintoma, ou que tenha sua eficácia comprovada cientificamente, e que sua utilização para fins terapêuticos seja fácil e de baixo custo (CARDOSO, 2004).

Apesar do surgimento da síntese química de medicamentos, que teve início no final do século XIX e evoluiu até os dias atuais, cerca de 25% dos medicamentos utilizados no mundo é de origem vegetal, mesmo em países industrializados, sendo esses medicamentos extraídos de mais de 90 espécies diferentes. A grande complexidade no estudo de plantas medicinais para a descoberta de novas drogas é o principal motivo para tantas pesquisas nessa área (FOGLIO et al., 2006; LINS, 2013).

3.2. Plantas medicinais no Brasil:

No Brasil, a utilização de espécies vegetais bioativas é anterior ao Período Colonial, integrando as práticas tradicionais das diversas nações indígenas (WALKER, 2013). Os relatos acerca da flora brasileira iniciaram-se logo após a descoberta. Na carta de Pero Vaz de Caminha, por exemplo, são citadas espécies vegetais e seus usos, como o do urucum - *Bixa orellana* L. (FILGUEIRAS e PEIXOTO, 2002). Pedro Álvares Cabral, observou entre

os povos indígenas o uso de produtos de origem vegetal para alimentação, tratamento de doenças e finalidades cosméticas. Posteriormente, Gabriel Soares de Souza em seu “Tratado Descritivo do Brasil” de 1587, denomina os produtos empregados na medicina indígena como “árvores e ervas da virtude” (WALKER, 2013).

Até os dias atuais, os frutos da “redescoberta” do uso de plantas medicinais podem ser vistos nos centros urbanos brasileiros, onde é comum a presença de estabelecimentos comerciais especializados na venda de produtos naturais. Outro indicativo desta revalorização é o ressurgimento nas feiras livres dos grandes centros urbanos da figura do raizeiro (LUZ, 2005). A veiculação cada vez mais frequente de informações relacionadas a tratamentos não convencionais e novos produtos alternativos pela mídia tem tido participação relevante no estabelecimento de novos padrões de comportamento, consumo e salubridade ditos “naturais” e “ecologicamente corretos” (ROCHA et al., 2015)

A diversidade biológica, socioeconômica, étnica e cultural presente ao longo do território brasileiro favoreceu a criação de sistemas de conhecimento terapêuticos únicos, cuja aceitabilidade pela população é alta, tanto nos ambientes rurais, quanto nos urbanos. Em ambos os casos as plantas medicinais são utilizadas como alternativa às drogas alopáticas (ALVES et al., 2008; GIOGETTI et al., 2007) representando uma fonte acessível de tratamento em especial para as populações carentes e/ou isoladas. Para este segmento, o acesso ao sistema de saúde pública e aos medicamentos convencionais pode ser limitado, dentre outros fatores, pelo alto custo dos fármacos sintéticos (ROCHA et al., 2015).

Na década de 70 a Organização Mundial de Saúde criou o “Programa de Medicina Tradicional”, motivando para o estabelecimento de políticas públicas que contemplassem a Medicina Tradicional, a Medicina Complementar e Alternativa (WHO, 2005).

Um marco foi a 8ª Conferência Nacional de Saúde (CNS), uma vez que, impulsionada pela Reforma Sanitária, aprovou no relatório final o incentivo ao uso da fitoterapia nos serviços de saúde, deliberando pela introdução de práticas alternativas de assistência no âmbito dos cuidados com a saúde, possibilitando ao usuário o acesso democrático de escolher a terapêutica preferida (LINS, 2013)

Em 1988, a Comissão Interministerial de Planejamento e Coordenação (CIPLAN), elaborou resoluções na perspectiva de disciplinar a introdução da homeopatia, da acupuntura, do termalismo, das técnicas Alternativas de Saúde Mental e da fitoterapia nos serviços de saúde (BATISTA e VALENÇA, 2012). Em consonância com estas iniciativas, surge a necessidade de serem desenvolvidos fitoterápicos nacionais para uso nos programas de saúde pública. Para tanto, o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de

Medicamentos do Ministério da Saúde (PPPM/CEME) financiou o estudo de um conjunto de plantas medicinais, de uso disseminado e já com estudos preliminares, que garantiam sua eficácia e sua segurança. Nos anos subsequentes, a exemplo do ocorrido na 8ª CNS, esta instância máxima de deliberação de políticas de saúde, recomendou a implantação da Fitoterapia e de outras práticas integrativas e complementares no SUS (BRASIL, 2006).

Na década de 1990, a OMS diagnosticou um decréscimo na qualidade do atendimento médico e nos serviços de saúde pública principalmente nos países em desenvolvimento, constatando uma distribuição extremamente perversa dos medicamentos. Esses dados mostraram que uma grande parcela da população não tem acesso a assistência à saúde e muito menos à farmacêutica. Assim, uma situação frequentemente observada pela OMS era o uso de plantas medicinais e outras terapias complementares na periferia do sistema oficial de saúde de competência do Estado. Dessa forma, buscou-se resolver, avaliar e criar regulamentos para recomendar aos Estados membros diretrizes que agregassem a medicina tradicional ao sistema oficial de saúde como forma de ampliar o acesso à atenção e à assistência farmacêutica (SAAD et al., 2009; LINS, 2013).

Assim, em maio de 2006, o Ministério da Saúde publicou a Portaria Nº 971, aprovando a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde, estimulando o uso da Medicina Tradicional/Medicina Complementar/Alternativa de forma integrada às técnicas da medicina ocidental moderna, observando os requisitos de segurança, eficácia, qualidade, uso racional e acesso (BRASIL, 2006). Em 22 de junho, do mesmo ano, foi publicado o decreto presidencial Nº 5.813 aprovando a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), no intuito de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006b).

Diversos estados brasileiros já adotaram a implantação de políticas públicas de plantas medicinais e fitoterápicos, a exemplo do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, bem como alguns dos estados da região Nordeste e Norte, além da região Sudeste. Essa prática pode ser uma alternativa para reduzir os gastos públicos com medicamentos, aliando a eficácia dessas plantas com o baixo custo operacional, tendo em vista a facilidade de acesso a essas plantas em nosso meio. Além do grande conhecimento popular, que aliado a todos esses fatores pode ser uma ferramenta importante para a participação da população na promoção e participação do processo curativo (SILVELLO, 2010).

O aumento da oferta de práticas integrativas que incluam o uso de plantas medicinais e fitoterápicos tem ganhado importância dentro da sociedade, enfatizando as práticas naturais de cuidado à saúde, o incentivo a criações de farmácias populares e prática de cidadania, englobando as iniciativas comunitárias, como o cultivo de hortos ecológicos. Além disso, permite a integração do saber popular ao científico (SILVELLO, 2010).

3.3. Importância do estudo fitoquímico de plantas medicinais

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos a serem observados consiste nas informações da medicina popular. Já é senso comum que é muito mais provável encontrar atividade biológica em plantas selecionadas a partir de critérios etnobotânicos, do que em plantas escolhidas ao acaso (YUNES, 2001).

Trabalhar com plantas é ingressar em um mundo vasto e variado. O estudo das plantas ativa nossas ideias e abre perspectivas para refletir sobre os conceitos de saúde, doença e tratamento. Por outro lado, a transmissão de informações pelo contato popular, eleva o nível de conhecimento em que podem observar dados grandiosos e diversificados da população (SILVA et al., 2010).

Entretanto, por mais que o conhecimento sobre plantas medicinais seja amplo, sempre é necessário cada vez mais pesquisas, pois é frequente o uso incorreto das mesmas. Consequentemente, há um grande risco devido ao acúmulo de substâncias ativas, quando ocorre a mistura e indicações terapêuticas semelhantes, sem nenhum conhecimento e comprovação científica das mesmas, causando intoxicações variadas desde uma simples dermatite até à morte (CARNEIRO et al., 2014).

Atualmente os estudos fitoquímicos abrangem a utilização de vegetais, e não apenas as plantas medicinais, para obtenção ou desenvolvimento de medicamentos, ou seja, como fonte de matéria-prima farmacêutica, descoberta de substâncias ativas de plantas como protótipo de fármacos, bem como o desenvolvimento de fitoterápicos. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre as espécies de interesse, a análise fitoquímica preliminar pode indicar os grupos de metabólitos secundário relevantes da mesma. Caso o interesse esteja restrito a uma classe específica de constituintes ou às substâncias responsáveis por certa atividade biológica, a investigação deverá ser direcionada para a extração, isolamento, purificação e a elucidação estrutural destas. Essa investigação científica com plantas medicinais envolve inúmeros aspectos importantes, um deles é o próprio caráter inter e multidisciplinar que, se por um lado, representa problemas, obstáculos e cuidados; por outro,

permite aos pesquisadores terem conhecimentos mais amplos e ricos que aqueles obtidos em linhas específicas de pesquisa. Estes elementos permeiam, passando pelo misticismo de muitas seitas e práticas de saúde que se utiliza das plantas medicinais, até o prazer e o desafio de estudar detalhadamente uma espécie vegetal (SIMÕES, 2001; SILVA et al., 2010).

3.4. O Bioma Caatinga:

O bioma da caatinga é um sistema ambiental exclusivamente brasileiro, que ocupa cerca de 7% do território nacional num total de 734.478 km², abrangendo os Estados do Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Sergipe, Alagoas, Bahia, Piauí e Norte de Minas Gerais (SANTOS, 2010) (Figura 1).



Figura 1: Mapa do Brasil e seus diferentes biomas (SANTOS, 2010)

As plantas da caatinga são adaptadas ao clima seco e a escassez de água, sendo também chamadas de xerófilas (Figura 2). Para sua sobrevivência, algumas plantas armazenam água, outras possuem raízes superficiais que captam a água da chuva e ainda há as que lançam outros recursos para diminuir a perda de água (transpiração), como poucas

folhas e espinhos. A vegetação é formada por três estratos: o arbóreo, o arbustivo e o herbáceo, abrangendo uma grande diversidade de espécies vegetais (SANTOS, 2010).



Figura 2- Vegetação típica do Bioma Caatinga

(Fonte: <http://www.diadaarvore.org.br/assets/biomas/caatinga.jpg>).

O estudo e a conservação da diversidade biológica da Caatinga é um dos maiores desafios da ciência brasileira, uma vez que esse bioma representa a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional. Proporcionalmente é a menos estudada entre as regiões naturais brasileiras, em que esforços científicos estão concentrados em alguns poucos pontos em torno das principais cidades da região (VELLOSO et al., 2002; LEAL et al., 2003; MELO-BATISTA E OLIVEIRA, 2014).

Atualmente 341 espécies no nordeste são utilizadas como medicinais, sendo 34 prioritárias para Caatinga, que estão inseridas no Projeto : Plantas para o futuro (PROBIO - Projeto de Conservação e Utilização Sustentável da Diversidade Biológica Brasileira), de competência do Ministério do Meio Ambiente (MELO-BATISTA e OLIVEIRA, 2008).

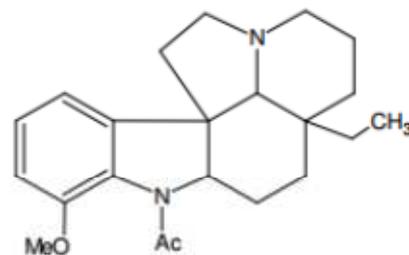
3.5. Família Apocynaceae:

Plantas da família Apocynaceae estão incluídas fitogeneticamente na ordem Gentiales e subclasse Asteridae, sendo consideradas como espécies dicotiledôneas bem evoluídas e são caracterizadas normalmente pela presença de látex (RAPINI, 2000). Compreende cerca de 2000 espécies distribuídas em aproximadamente 200 gêneros, sendo

encontradas predominantemente, nos trópicos e subtropicais e, menos frequentes em regiões temperadas (NICHOLAS, 1994; ROCHA e. al., 1982; STRUWEL, et. al., 1994; RIBEIRO, 1999).

Na flora brasileira são catalogadas como apocináceas mais de 400 espécies em 41 gêneros, sendo 32 destes encontrados apenas na Amazônia (CAMPBELL e HAMMOND, 1989). Na família Apocynaceae, as espécies do gênero *Aspidosperma* são encontradas apenas na América, principalmente entre o México e a Argentina (CORRÊA, 1926). Em 1951, foram classificadas 52 espécies de *Aspidosperma* em 9 séries e, em 1983, outras 18 espécies foram incluídas nesse gênero (ROBERT, 1983). Em 1987, uma nova classificação quimiotaxonômica das espécies nesse gênero foi proposta, compreendendo 48 espécies em 7 séries (BOLZANI, 1987) (GARCIA, RUBEN e BROWN, 1976).

Essa família é de considerável importância econômica e medicinal, sendo algumas de suas espécies cultivadas em quintais (por exemplo, *Nerium oleander* L.), jardins (por exemplo, espécies de *Catharanthus*) ou em estufas (por exemplo, espécies de plantas *Allemanda*). Enquanto algumas espécies de árvores desta família são valorizadas por sua madeira, outras possuem importância terapêutica em virtude do acúmulo de glicosídeos cardiotônicos e de alcaloides com atividade biológica. É particularmente rica em alcaloides indólicos monoterpênicos, um grupo de compostos quimicamente diversificados, que representa 25% dos 12.000 ou mais alcaloides já identificados, a exemplo da aspidoespermina (Figura 3), substância já isolada em algumas espécies da família Apocynaceae (DE LUCA e ST. PIERRE, 2000; LORENCE e NESSLER, 2004; ARAÚJO et al, 2007).



aspidoespermina

Figura 3: Estrutura química do alcaloide indólico aspidoespermina (DIAS, 2012)

Segundo a literatura, esse grupo de alcaloides constituem bons marcadores quimiotaxonômicos para classificação botânica das espécies de *Aspidosperma* (ALLEN e HOLMSTEDT, 1980; DUARTE, e MIRANDA et al, 1983; MITAINE et al., 1996; PEREIRA et al., 2007).

Até 1956 eram conhecidos apenas quatro alcaloides indólicos isolados de espécies de *Aspidosperma*. Atualmente, esse número ultrapassa a 100 alcaloides (JÁCOME, 1998; PEREIRA, 2007).

Entre os gêneros pertencentes à família Apocynaceae nos quais já foram encontrados alcaloides indólicos, os mais importantes são: *Catharanthus*, *Rauwolfia*, *Alstonia*, *Kopsia* e *Aspidosperma*. Várias espécies de *Alstonia* são utilizadas na medicina tradicional em todo o Sudeste Asiático para o tratamento de malária e disenteria (KAM et al., 1999; ARAÚJO et al, 2007).

3.6. O Gênero *Aspidosperma*:

O gênero *Aspidosperma* Mart. ocorre desde o México até a Argentina. Toda a planta é bastante amarga, o que pode ser atribuído aos seus alcaloides. Esse amargor até certo ponto, facilita seu reconhecimento, mesmo quando totalmente desfolhada ou sem folhas ou frutos (NÓBREGA, 2008).

De acordo com Dias (2012): “Arndt, et al. (1967) identificou vários alcaloides em espécies de apocináceas como: picralina, diacetilpicralina, carapanaubina e reserpilina de *Aspidosperma rigidum*; metoxidiidrocorinanteol de *Aspidosperma nitidum*; aricina, reserpilina, demetoxiaspidospermina e aspidocarpina de *Aspidosperma marcgravianum*; uleína, aparicina, dasicarpidona e estemadenina de *Aspidosperma pyricollum*; uleína e diidrouleína de *Aspidosperma nigricans*, e uleína e hidroxiaetil-aspidospermatidina de *Aspidosperma tomentosum*.”

Mitaine et al. (1996), cita os alcaloides olivacina e guatambuína como substâncias antitumorais isoladas de *Aspidosperma olivaceum* Müll. Arg., *Aspidosperma australe* Müll. Arg. e *Aspidosperma longepetiolatum* Kuhlm (DIAS, 2012).

Em um outro estudo feito em Mitaine e colaboradores, foi descoberta a presença dos alcaloides fendlerina, aspidoalbina e aspidolimidina em *Aspidosperma megalocarpon* Müll. Arg (MITAINE et al., 1996).

Reis et al. (1996), isolou da *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg., os alcaloides ramiflorina A e B.

Os alcaloides quebracamina e aspidospermina, os quais funcionam como bloqueadores adrenérgicos, foram isolados de *Aspidosperma auriculatum* Markgr.(BARBOSA et al., 2010).

Jàcome et al. (2004), isolou da espécie *Aspidosperma parvifolium* A. DC. metiltetraidroelipticina, uleína, epiuleína, aparicina, desmetiluleína, lupeol e estigmasterol (DIAS, 2012).

Em 2004, Ferreira e colaboradores testaram o extrato clorofórmico básico da espécie *Aspidosperma ramiflorum* Müll. Arg. sobre promastigotas de *Leishmania braziliensis* e *Leishmania amazonensis* e verificaram que este extrato alcaloidal, o qual continha como constituintes majoritários os alcaloides ramiflorina A e B, foi mais efetivo sobre *L. amazonenses*. Posteriormente, em 2007, os alcaloides ramiflorina A e B foram testados sobre promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonenses*, verificando-se uma DL50 de 16,3 e 4,9 mg mL⁻¹ para ramiflorina A e B, respectivamente. Estes resultados mostraram-se promissores ao comparar com o resultado do medicamento utilizado na prática clínica, a pentamidina, a qual apresentou DL₅₀ de 10,0 mg mL⁻¹ ((FERREIRA et al., 2004; TANAKA et al., 2007; DIAS et al., 2012).

Das cascas da espécie *Aspidosperma vargasii* A. DC. foram isolados os alcaloides elipticina e N-metiltetra-hidroelipticina e da espécie *Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg., o alcaloide aspidocarpina (HENRIQUE et al., 2010; DIAS, 2012).

Segundo Pereira (2007), “A espécie *A. nitidum* é utilizada como anticonceptiva, no tratamento de inflamações de útero e ovário, em diabetes, em problemas estomacais, contra câncer, febre e reumatismo. Cascas de *A. nitidum*, *A. album*, *A. discolor*, *A. excelsum* e *A. polineuron* são usadas por nativos de diferentes locais da Amazônia no tratamento da malária. A atividade antimalárica atribuída a essas espécies foi comprovada por testes *in vitro* e *in vivo*. Na Colômbia, o látex dessas espécie é utilizado pelos índios Makuna e Taiwano no tratamento da hanseníase. Cascas de *A. quebracho blanco* são usadas na região andina como afrodisíaco e contra febre. No Brasil, essa espécie é usada também em casos de enfisema, bronquite e pneumonia, bem como no tratamento de impotência contra sintomas da hiperplasia prostática benigna e em dispnéia asmática e cardíaca”.

Biologicamente, muitos alcaloides indólicos agem provavelmente nos sistemas neurotransmissores opiáceos, GABAérgicos, colinérgicos, muscarínicos, serotoninérgicos e dopaminérgicos. Por isso, são empregados largamente como hipotensor arterial, simpatolítico, diurético, vasoconstrictor periférico, estimulante respiratório, anestésico, agente bloqueador adrenérgico, espasmogênico intestinal, sedativo e relaxante do músculo

esquelético. Além disso, são responsáveis pelos efeitos alucinógenos do tabaco, de bebidas e rapés utilizados por nativos da Amazônia, bem como pelas propriedades sedativas (RIVAS et al., 1998; BIEL et al., 1959; ALLEN e HOLMSTEDT, 1980; PEREIRA, 2007).

Muitos alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* apresentam efeitos mutagênicos em *Salmonella typhimurium*, em culturas de células mamárias e em células pulmonares, além de efeitos inibitórios sobre monoamino oxidase em tecido animal, crescimento e mitose de fibroblastos cardíacos. A atividade desses alcalóides em células de eucariontes e procariontes tem sido atribuída à sua capacidade de intercalação quando interagem com o DNA (NUNES et al., 1992; PICADA et al., 1997; PEREIRA, 2007).

Testes contra a doença de Chagas mostraram que esses alcaloides são ativos contra epimastigotos de *Trypanosoma cruzi*. O aumento da atividade tripanosomicida de alcaloides indólicos é verificado quando há substituição na posição C-7 do anel indólico (RIVAS et al., 1999).

Alcaloides indólicos isolados de *A. marcgravianum* mostraram atividades antimicrobiana e citotóxica, enquanto aqueles isolados das cascas das raízes de *A. excelsum* Benth apresentaram atividade antimicrobiana frente a *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* (VERPOORT et al., 1982; GILBERT, 1966; PEREIRA, 2007).

Em estudo realizado por Oliveira et al. (2009), dois novos alcaloides indólicos com esqueleto plumerano, espruceanuminas A e B e oito alcaloides indólicos conhecidos, aspidospermidina, desmetoxipalosina, aspidocarpina, aspidolimina, fendlerina, aspidolimidina, obscurinervidina e obscurinervina, foram isolados do extrato metanólico das cascas do caule e sementes de *Aspidosperma spruceanum*.

Ensaio biológico de muitos alcaloides monoterpênicos isolados das cascas de *A. quebracho-blanco* indicaram atividade bloqueadora α -adrenérgica e ação inibitória de contrações de músculo liso de tecidos de diferentes animais, além de ação hipotensora e analgésica, além disso, alcaloides das cascas das raízes e das folhas de *A. pyrifolium* também mostraram efeito hipotensivo forte na pressão arterial. (PEREIRA, 2007).

Araújo et al. (2007) isolou de *Aspidosperma pyrifolium* os alcaloides aspidofractinina, 15-dimetoxipirifolina e N-formilaspidofractinina (DIAS, 2012).

3.7. *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Aspidosperma pyrifolium Mart. (figura 4), é uma planta da família Apocynaceae, conhecida como pereiro, pau-pereiro, pereiro-vermelho, pau-de-coaru (CORREA, 1978). É

uma planta presente em todos os Estados do Nordeste, além do norte de Minas Gerais. Tem larga dispersão em toda a zona da caatinga, sendo geralmente encontrada na zona do sertão baixo do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, em vários tipos de solos e entre pedras e rochedos. É considerada uma espécie endêmica na caatinga (MAIA, 2004; SANTOS, 2010).

Segundo Maia (2004): “possui tronco bem desenvolvido, ereto, mas não muito grosso podendo chegar de 15 a 20 cm de diâmetro. A copa é normal, a casca é lisa e acinzentada, com lenticelas brancas quando a planta é jovem, e rugosa quando mais idosa. As folhas são ovais, simples, amargosas, glabras ou pilosas (Figura 4). Suas flores são pequenas, de cor clara e possuem um perfume muito agradável que exala no ambiente durante a noite. O fruto é em forma de gota achatada (também conhecido popularmente como “galinha”), de cor castanho-claro, com pequenas verrugas de cor cinza, que comporta cerca de 5 sementes, aladas e planas (Figura 5). A madeira do Pereiro é de cor clara, moderadamente pesada, macia e de fácil trabalho, resistente e muito durável, de textura fina e uniforme.”



Figura 4: Planta adulta do Pereiro (Fonte: SANTOS, 2010).



Figura 5: Fruto do Pereiro (Fonte: www.fapepi.pi.gov.br/carrasco/dothumb.php?img.)

Sua floração vai de setembro a janeiro e a frutificação de janeiro a março (BRAGA, 1976 e TIGRE, 1968). Possui várias utilizações, dentre elas, a sua madeira é bastante usada para serviços de carpintaria (TIGRE, 1968), para fazer carvão, cerca e lenha.

Como planta ornamental, por ser uma árvore de pequeno porte e pela beleza da sua copa, pode ser empregada no paisagismo de lugares em geral. Também é utilizada na recuperação de áreas degradadas, inclusive em matas ciliares. É uma das poucas espécies indicadas para a recuperação de áreas em processo de desertificação, por sua importância ecológica e adaptação às mais severas condições de seca e solos rasos ou pedregosos. Os sistemas agroflorestais empregam o Pereiro para compor faixas arbóreas (corredores) entre as plantações, fornecendo alimento para abelhas e produzindo madeira. Na medicina popular, é utilizado no tratamento de distúrbios respiratórios e febre. A casca é utilizada como remédio para o estômago e como anti-emético. Na medicina veterinária popular é utilizado no tratamento de ectoparasitoses dos animais domésticos como sarnas, piolhos e carrapatos (SANTOS, 2010).

Mitaine-Offer et al. (2002), demonstram atividade antiplasmódica da aspido-permina, alcaloide indólico isolado de *A. pyrifolium*. e *A. megalocarpon*, sendo estimada em 72 horas uma CI_{50} entre 3,2 e 15,6 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente.

Nóbrega (2008), avaliou o perfil fitoquímico e farmacológico dessa espécie a partir de ensaios não-clínicos. Para a determinação da atividade antineoplásica, testou-se o extrato metanólico por via intraperitoneal em camundongos fêmeas. O extrato apresentou percentual de inibição de 73,9% para a dose de 7 mg/kg; 61,5% para a dose de 14 mg/kg e 28,5% para

a dose de 28 mg/kg, em comparação com o fármaco padrão (metotrexato), que apresentou 48,6% de inibição do crescimento tumoral. Os resultados da toxicidade apresentaram por via intraperitoneal os seguintes efeitos: agitação, movimentos estereotipados circulantes e de vibrissas, piloereção, reação de fuga, irritabilidade, exoftalmia, aumento da frequência cardiorrespiratória, tremores grosseiros, contorções abdominais e convulsões. No ensaio microbiológico, os resultados confirmaram capacidade de inibição do crescimento bacteriano *in vitro* frente a cepas de *S. aureus* (ATCC 6538) e *M. luteus* (ATCC 9341), corroborando com relatos populares. Quanto ao perfil fitoquímico, foi detectada a presença de triterpenos, esteroides, iridoides, saponosídeos, açúcares redutores, flavonoides, assim como reação negativa para glicosídeos cardíacos.

Lima et al. (2010), demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *Aspidosperma pyrifolium*, foi capaz de ocasionar efeito hemolítico e também efeito tóxico em larvas de *Artemia salina*, ambos dependentes de concentração.

Em pesquisa realizada por Santos (2010), em que avaliou-se a eficácia do extrato alcoólico *Aspidosperma pyrifolium* Mart. contra a espécie de carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (que vem sendo uma das principais causas de perdas econômicas na agropecuária bovina no país), fêmeas ingurgitadas de carrapatos foram coletadas em bovinos naturalmente infestados e mantidas em placas de Petri. Utilizou-se extrato alcoólico das folhas de pereiro nas proporções de 1:50, 1:100, 1:250. Os grupos controle foram tratados com água destilada (controle negativo) e amitraz (Carvet® - Mogivet) (controle positivo). Como resultado, o extrato apresentou eficácia de 88,58% (PE1), 91,52% (PE2), 79,21% (PE3), respectivamente.

De acordo com SILVA et. al (2011): “flavonoides, bem como outros compostos orgânicos presentes na casca do Pereiro agem no combate a inflamações do trato urinário e dermatites”.

Recentemente um estudo apontou *Aspidosperma pyrifolium* Mart. como bom agente larvicida contra *Aedes aegypti*, nome científico do vetor causador da dengue (MEDEIROS e XIMENES, 2007). Além disso, testes utilizados para avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* com extrato metanólico dessa planta sinalizaram uma capacidade de inibição do crescimento de bactérias gram-positivas, principalmente da família Micrococaceae (NOBREGA, 2008).

Messiades (2014), testou doses de 62,5, 125 e 250 mg/kg de EEB dessa espécie para avaliar atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva em modelos animais e mostrou que, para o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, a dose de 125 mg/kg

apresentou 100% inibição, causando maior eficácia que o controle positivo (Dipirona 500 mg). Ainda nesse mesmo estudo, em que também foi realizada uma prospecção fitoquímica do EEB, foi detectada a presença de compostos fenólicos (dentre eles os flavonoides), saponinas, bem como de taninos e alcaloides indólicos, que de acordo com outros estudos, são substâncias que compõem o arsenal terapêutico dessa espécie. No mesmo trabalho também foi possível determinar um potencial antimicrobiano positivo do EEB frente a cepas de *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomona aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

Lima (2014), realizou estudo sobre a composição química, atividade antioxidante, antimicrobiana, bem como efeito ionotrópico de extratos produzidos a partir da entrecasca do caule de *A. pyrifolium*. Foi detectado nesse estudo um maior teor de compostos fenólicos na fração acetato de etila (FAE), seguida da fase hidroetanólica (EHE). Já em relação ao teor de flavonoides totais, o maior valor também foi observado na FAE, seguido da fase clorofórmica (FCL). Com relação à atividade antioxidante, a FAE reduziu o radical 2,2 difenil-1-picril-hidrazila DPPH^{*} (30µg/mL, 60 min) com valor de CE₅₀ de 27,13±3,61 µg/mL. Por outro lado, frente ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), a FAE seguido do EHE mostraram maior afinidade em neutralizar a lipoperoxidação induzida pelo FeSO₄. Ainda no mesmo estudo a FCL e FAE da entrecasca de *A. pyrifolium* apresentaram atividade antimicrobiana frente a alguns microrganismos Gram +, Gram – e levedura com halos de inibição de 10±0,00 a 21,5±0,71 mm. Em relação ao efeito inotrópico o EHE apresentou inotropismo negativo com CE₅₀ de 1893±380 µg/mL e a FAT (fração de alcaloides totais) apresentou inotropismo positivo com CE₅₀ de 1846±825 µg/mL, sendo o mecanismo de ação deste último por via adrenérgica. Através da CLAE/DAD-UV-VIS foi confirmado também a presença de compostos fenólicos e de alcaloides nessa espécie.

Nogueira et al. (2014), realizou análise fitoquímica da fração aquosa do extrato etanólico de sementes de *Aspidosperma pyrifolium*, mostrando que a espécie é uma fonte promissora de alcaloides plumerânicos. A fração aquosa mostrou um efeito antinociceptivo significativo na fase final do teste de formalina, reduzindo o tempo de lambertura da pata em relação ao controle para um valor semelhante à morfina (5,25 ± 2,13). Mostrou também efeito anti-inflamatório, causando a redução do edema de pata induzido por carragenina quando comparado com controle. As curvas de dose-resposta revelaram que as melhores doses de APSE-AQ (fração aquosa de *A. pyrifolium*) foram de 100 mg kg⁻¹ para nocicepção induzida por formalina [(20,0 ± 3,24) na fase inicial, e (6,00 ± 2,00) na fase tardia] e 200 mg kg⁻¹ para contorções abdominais induzidas por ácido acético (23,25 ± 2,56).

Em estudo realizado por Rodrigues (2015), onde foram testadas doses de solução oral produzida a partir do EEB da casca do caule de *A. pyrifolium*, foi possível estabelecer atividade anti-inflamatória e antinociceptiva eficazes em modelos animais, onde para o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético o percentual de inibição foi de 89,4% na dose de 250 mg/kg, quando em comparação com controle positivo. Já no teste de peritonite induzida por carragenina, o percentual de inibição para a mesma dose foi de 93,53%.

Viana (2015), testou a bioatividade dos extratos obtidos da parte aérea de *Aspidosperma pyrifolium* sobre larvas de *Aedes aegypti*. De acordo com a análise fitoquímica realizada com o extrato bruto etanólico, foi detectada a presença de bases quaternárias, catequinas, esteroides livres, flavonóis, flavanóis, flavononas, flavonas, resinas, saponinas, taninos condensados, triterpenoides e xantonas. A análise da Ressonância Magnética Nuclear indicou a presença de catequinas, esteroides livres, flavonóis, flavanóis e flavononas nas frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila. Saponinas foram detectadas nas frações diclorometânica e acetato de etila, assim como taninos condensados e heterosídeos cianogênicos na fração diclorometânica. Foram ainda identificados triterpenoides nas frações hexânica e diclorometânica. Ainda nesse estudo, com relação a fração hidroalcóolica foram indicados a presença de derivados cinâmicos e glicosídeos, sendo estes, também, detectados na fração acetato de etila. As agliconas esteroidais e triterpenoides foram indicados somente na fração hexânica. Dentre os métodos de obtenção dos extratos aquosos, a maceração, realizada com a parte aérea fresca de *Aspidosperma pyrifolium* apresentou maior toxicidade sobre as larvas de *Aedes aegypti*. Nesse estudo, a fração diclorometânica foi a que demonstrou uma maior mortalidade larval sobre o vetor quando comparado ao extrato etanólico, a fração hidroalcóolica e as misturas compostas pelas frações diclorometânica + acetato de etila e diclorometânica + hexânica.

LIMA (2015) em estudo fitoquímico realizado a partir de extrato aquoso dessa mesma espécie mostrou presença do flavonoide rutina pela técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Ainda nesse mesmo estudo foi avaliada a atividade antipeçonhenta através de modelos de peritonite induzida por carragenina e peritonite induzida pelo veneno de *Tityus serrulatus* (espécie de escorpião bastante venenosa), e em modelos de edema local e infiltrado inflamatório induzido pelo veneno de *Bothrops jararaca* (serpente), administrados pela via intravenosa. Os resultados demonstraram que o pré-tratamento com extrato aquoso e frações reduziram a migração de leucócitos totais para a cavidade abdominal no modelo de peritonite causada por carragenina e no modelo de

peritonite induzida por veneno de *T. serrulatus*. O extrato aquoso e as frações apresentou também atividade antiedematogênica, no modelo de edema local causado pelo veneno de *B. jararaca*, e reduziu o infiltrado inflamatório para o músculo. Os soros (anti-aracnídico e anti-botrópico) específicos para cada veneno atuaram inibindo a ação inflamatória dos venenos e foram utilizados como controles. O composto rutina, identificado no extrato, também foi testado e, assim como o extrato da planta, exibiu efeitos anti-inflamatórios significativos, nas doses testadas. O resultado do ensaio de citotoxicidade utilizando o Brometo de 3- (4,5- dimetiltiazol)-2,5-difenil-tetrazolium (MTT), demonstrou que o extrato aquoso da espécie vegetal apresentou baixa toxicidade para células provenientes de fibroblasto de embrião de camundongo (3T3).

3.8. Propriedades tóxicas de *A. pyrifolium* Mart.

A toxicidade de uma substância é a capacidade intrínseca de afetar negativamente ou causar dano a um organismo. Os estudos toxicológicos quando aplicados em animais de laboratório e, sob condições previamente estabelecidas, permitem determinar os possíveis efeitos de substâncias ou plantas tóxicas para humanos ou animais expostos às mesmas. A avaliação toxicológica é realizada com ensaios biológicos em animais e os resultados são extrapolados para humanos e animais. Nestes casos, os exames hematológicos, bioquímicos, a autópsia geral, a histopatologia e a manutenção do grupo controle para fins de comparação também podem ser realizados, bem como a avaliação do estado geral dos animais e a observação dos efeitos tóxicos (LIMA et al., 2003; BARROS e DAVINO, 2003).

A avaliação toxicológica em organismos vivos pode envolver observação de efeitos obtidos após 24 horas da administração (toxicidade aguda) ou após administrações em doses repetidas (toxicidade subcrônica e crônica) (GOMES, 2011).

A avaliação da toxicidade aguda tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL_{50} (dose letal mediana). Este parâmetro é útil para se identificar a toxicidade relativa da substância frente a animais de experimentação (BARROS e DAVINO, 2003), fornecendo subsídios à cerca dos riscos à saúde, resultantes de uma exposição de curta duração, como também, para determinar as doses adequadas para estudos farmacológicos (BRITO, 1994).

O potencial tóxico da espécie *Aspidosperma pyrifolium* já vem sendo destacado por vários produtores em vários estudos no Nordeste brasileiro. Em entrevistas aplicadas aos

produtores de 17 municípios do Estado do Rio Grande do Norte, especificamente no Seridó Ocidental e Oriental, na busca de plantas tóxicas dessas localidades, o pereiro foi identificado como uma planta tóxica para bovinos, caprinos e ovinos, que causam naturalmente abortos ou nascimento de animais débeis. Também foi identificada a ocorrência de intoxicações por alterações no nervoso, caracterizadas por rigidez dos membros posteriores, com dificuldade de locomoção envolvendo bovinos, muares e equinos. Um destaque para a época de maior ocorrência dessas intoxicações é no período de estiagem, quando a espécie ainda está verde e suas folhas estão entre as últimas a cair (SILVA et al., 2006).

Outro estudo realizado também no Rio Grande do Norte, nas mesorregiões Central e Oeste buscou determinar plantas tóxicas de interesse zootécnico em 35 municípios. Nessa situação, os surtos de intoxicações por *Aspidosperma pyriformium* relatados pelos produtores ocorreram em caprinos e bovinos, acometendo neles malformações, caracterizadas por flexura dos membros pélvicos, prognatia, braquignatia, microftalmia, dermoide ocular e atresia anal (SILVA et al., 2006).

Em Patos, Paraíba, a espécie foi identificada como planta tóxica para caprinos. Os animais abortavam quando ingeriam a espécie em diferentes fases de gestação. Também foi observado que os abortos ocorriam no período seco seguido de chuvas. Quando a planta era consumida nos primeiros 35 a 40 dias de gestação das cabras, ocorriam perdas embrionárias (Figura 6) (RIET-CORREA et al, 2011).

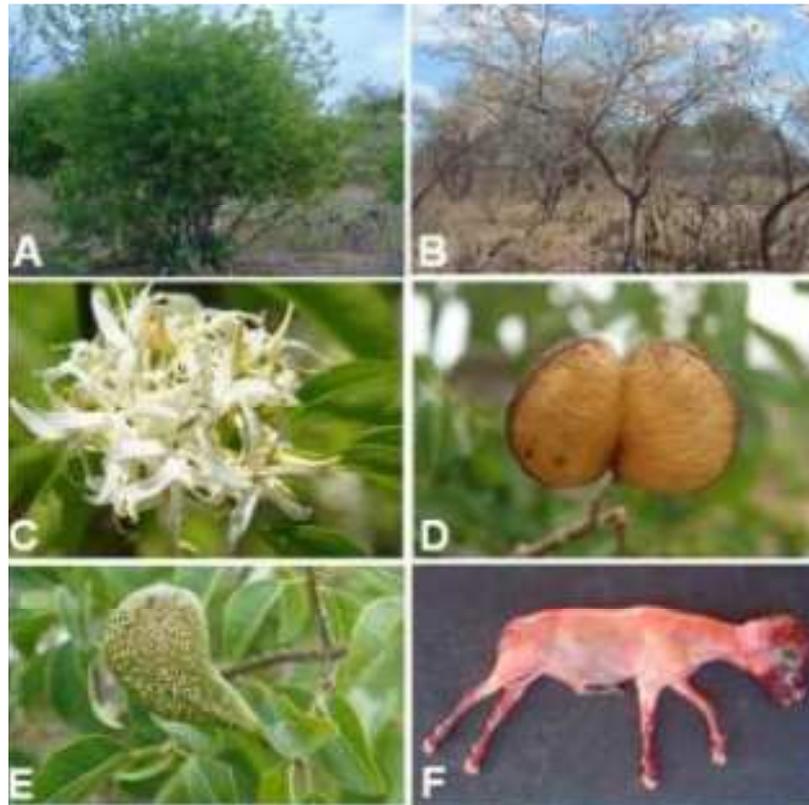


Figura 6: A-E) *Aspidosperma pyrifolium*. A e B) Árvores. C) Flor. D e E) Vagens. F) Feto de ovelha intoxicada por *A. pyrifolium* (RIET-CORREA et al., 2011).

Um levantamento das intoxicações por plantas em 20 municípios do Sertão Paraibano também foi realizado. Os entrevistados relataram surtos de abortos associados ao consumo da *A. pyrifolium* em caprinos, ovinos e bovinos (ASSIS et al., 2009).

Casos espontâneos de aborto em caprinos depois da ingestão da planta também foram observados em 6 fazendas dos municípios de Mossoró-RN e Angicos-RN. A maioria dos casos de aborto ocorreu durante a estação seca e início da estação chuvosa, com as cabras velhas sendo menos afetadas do que as cabras jovens (MEDEIROS et al., 2004).

Em estudo experimental realizado com cabras, em diferentes fases de gestação, alimentadas com folhas verdes recém-colhidas de *A. pyrifolium*, na dose de 4g/kg, durante 19 dias de consumo foi observado que elas foram capazes de provocar aborto e perdas embrionárias. Já as folhas dessecadas não foram capazes de provocar alterações reprodutivas, embora a ingestão da planta nos primeiros 34 dias de gestação possa causar mortalidade embrionária (MEDEIROS et al., 2004).

Um estudo de toxicidade em ratos e citotoxicidade *in vitro* com extrato etanólico de *Aspidosperma pyrifolium* administrado em ratos machos e fêmeas da linhagem *Wistar* demonstrou que as fêmeas apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade

materna, além de distúrbios motores e morte nas concentrações mais elevadas. Os ratos machos se apresentaram mais resistentes do que as fêmeas. Também foi verificado o extrato de *A. pyrifolium* promoveu hemólise e foi letal para o organismo *Artemia salina* (LIMA, e SOTO-BLANCO, 2010).

A toxicidade aguda também já foi testada para *Aspidosperma pyrifolium* em camundongos adultos albinos Swiss, com administração intraperitoneal de extrato metanólico da casca de *A. pyrifolium*. Foram analisadas alterações comportamentais e sinais de toxicidade dos camundongos, como reações com características depressoras, ambulação diminuída, flacidez muscular e analgesia (diminuição dos reflexos). Outros efeitos observados foram contorções abdominais, tônus da musculatura abdominal, espasmos e irritação da conjuntiva. (NÓBREGA, 2008).

Em estudo realizado por Costa (2015) foi avaliada a existência de efeito tóxico e citotóxico de extratos aquosos de folhas secas e frescas de *A. pyrifolium* sobre o crescimento de raízes e células em divisão do sistema teste *Allium cepa*. O teste foi realizado utilizando três concentrações, 5 mg/L, 50 mg/L e 300 mg/L, sendo o controle negativo água destilada. As análises de crescimento de raízes, inibição relativa e índice mitótico foram utilizados na avaliação da toxicidade e citotoxicidade. Os bioensaios realizados revelaram que o extrato aquoso das folhas secas não mostrou efeito tóxico nem citotóxico nas concentrações testadas, contudo, estimulou a divisão celular na concentração de 50 mg/L, podendo ser um indicativo de formação de células tumorais. As folhas frescas foram tóxicas na concentração de 300 mg/L e teve efeito tóxico subletal na concentração de 5 mg/L, sem promover efeito citotóxico.

3.9. Metabólitos secundários obtidos a partir de plantas

Metabólitos secundários são compostos orgânicos, que na maioria das vezes, são biossintetizados a partir de carboidratos, proteínas e/ou lipídeos (metabólitos primários). Não estando diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos, a sua ausência não resulta na morte imediata. No entanto, a longo prazo pode afetar a sobrevivência, funcionalidade ou estética. Esses metabólitos estão geralmente associados a uma infinidade de atividades que vão desde a defesa vegetal contra um ataque microbiológico (fitotoxinas) à defesas interespecíficas e ação alelopática, por exemplo (GOBBO-NETO et al., 2007).

De acordo com Harborne (1998) “Os metabólitos secundários têm sido sumariamente definidos como compostos pouco abundantes, pelo fato de sua estocagem ocorrer em órgãos ou células específicos”.

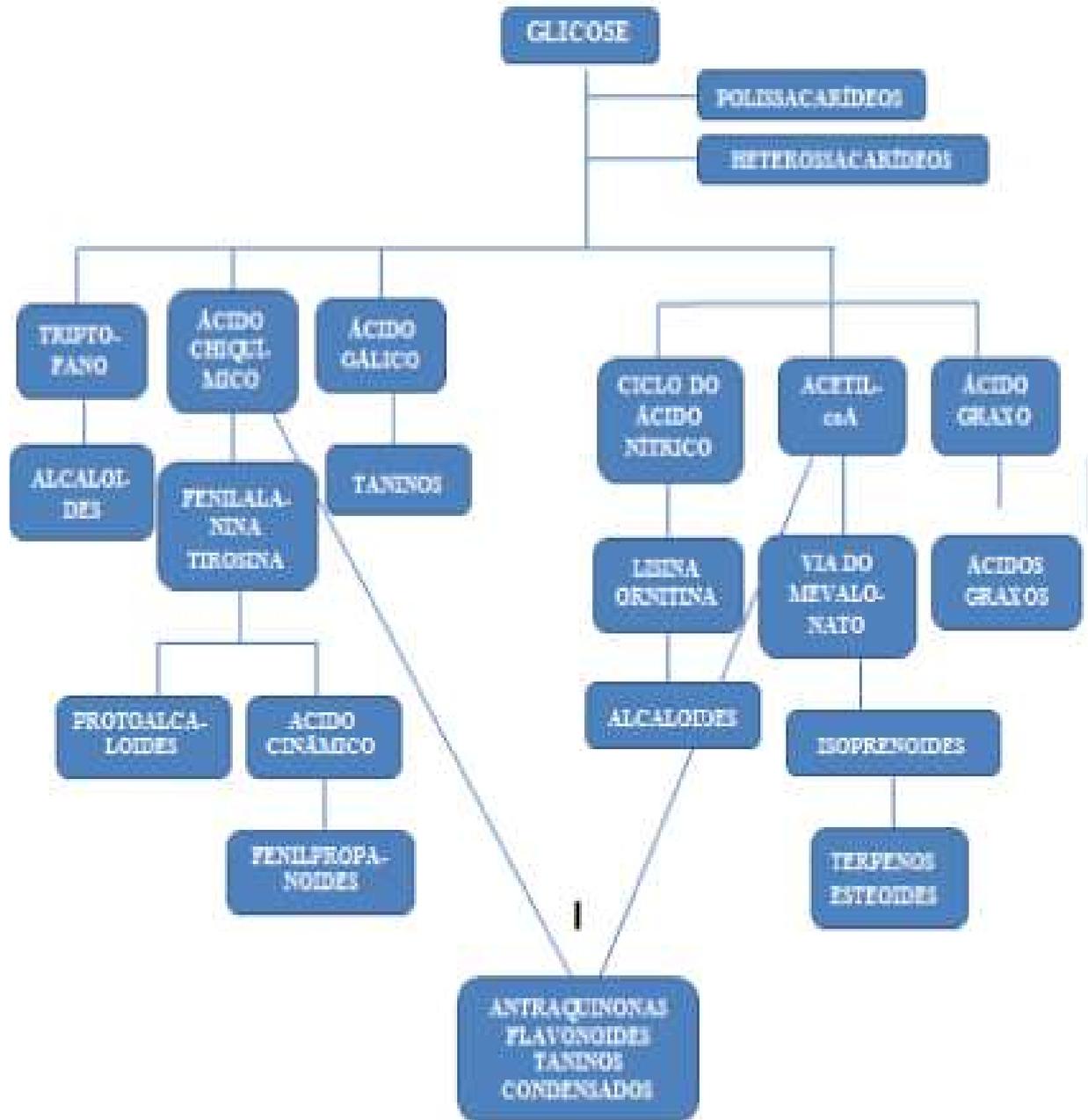
O desenvolvimento nas técnicas analíticas no século XX como, por exemplo, os diversos tipos de cromatografia, permitiram isolar mais destas moléculas, constituindo-se como a base para o estabelecimento da disciplina de Fitoquímica (HARBORNE, 1998).

Os metabólitos secundários têm um papel importante na adaptação das plantas ao meio onde estão inseridas. Essas moléculas contribuem para que as mesmas possam ter uma boa interação com os diferentes ecossistemas (MESSIADES et al., 2014).

Os produtos secundários aumentam a probabilidade de sobrevivência de uma espécie, pois são responsáveis por diversas atividades biológicas com este fim como, por exemplo, podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas dos patógenos, e também apresentando atividades antigerminativas ou tóxicas para outras plantas, fitoalexinas. Dentro desse mesmo contexto, alguns destes metabólitos constituem importantes compostos que absorvem a luz ultravioleta evitando que as folhas sejam danificadas (FAMAGALI et al., 2008).

Os compostos secundários de plantas são usualmente classificados de acordo com a sua rota biossintética (HARBORNE, 1999). As três famílias de moléculas principais são geralmente consideradas: os compostos fenólicos (taninos, flavonoides, etc); terpênicos e os compostos nitrogenados (alcaloides) (MESSIADES, 2014).

Os terpenos são sintetizados a partir da via da Acetil-Coa, via rota do ácido mevalônico ou via rota do metileritriol fosfato (MEP). Os compostos fenólicos são sintetizados a partir de duas rotas principais: a do ácido chiquímico e a do ácido mevalônico e os compostos nitrogenados são sintetizados a partir de aminoácidos (FAMAGALI et al., 2008) (Fluxograma 1)



Fluxograma 1: Origem dos metabólitos secundários de plantas (MARTINS, 2012).

3.9.1. Compostos Fenólicos:

São substâncias caracterizadas por possuírem pelo menos um anel aromático com uma ou mais hidroxilas ligadas. Geralmente são sólidos, cristalinos, tóxicos, ácidos, solúveis em água e visíveis a luz ultravioleta. Os mais abundantes são constituídos a partir de ácidos

benzoicos ou cinâmicos, a exemplo das cumarinas, taninos, lignanas e os flavonoides (MESSIADES, 2014)

3.9.2. Terpenos

Os terpenos, conhecidos também como terpenoides, são compostos que constituem uma classe de produtos naturais obtidos das plantas e que apresentam uma grande variedade estrutural e funcional (RAVEN et al., 2001; PHILLIPS et al., 2008).

Todos os terpenoides são formados pela fusão de unidades isoprênicas de cinco carbonos e quando submetidos a altas temperaturas, podem se decompor em isoprenos, o que pode assim referir-se a todos os terpenos como isoprenoides. A classificação dos terpenos pode ser feita de acordo com o número de unidades de isopreno que vão se ligando entre si, orientadas em sentido inverso (cabeça-cauda) podendo ser: hemiterpenoides (C5), monoterpenoides (C10), sesquiterpenoides (C15), diterpenoides (C20), triterpenoides (C30) e carotenoides (C40). O isopreno (IP) é produzido naturalmente, mas não está envolvido diretamente na formação dos produtos pertencentes a estas classes. As unidades bioquimicamente ativas de isopreno são na realidade o dimetilalil pirofosfato (DMAPP) e o isopentenil pirofosfato (IPP) (NIERO e MALHEIROS, 2007; SILVA, 2013).

Os hemiterpenoides (C5) são o menor grupo dos terpenos, sendo que o seu representante mais conhecido e estudado é o isopreno, um produto volátil liberado de tecidos fotossinteticamente ativo (CROTEAU et al., 2000).

Os monoterpenoides (C10) são compostos por duas unidades de isopreno. Devido a seu baixo peso molecular, costumam ser voláteis, sendo, portanto os constituintes dos óleos essenciais e das essências voláteis, atuando principalmente na atração de polinizadores. Os monoterpenos podem ser isolados através de destilação ou extração e atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais (OLIVEIRA et al., 2003).

Os sesquiterpenos, em geral, podem atuar como compostos antimicrobianos contra fungos e bactérias (fitoalexinas) e anti-herbivoria (NIERO; MALHEIROS, 2007).

Os diterpenoides compreendem um grande grupo de compostos não voláteis, possuindo uma vasta gama de atividades diferentes que incluem os hormônios, ácidos resínicos e agentes anticancerígenos (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003). Peres (2004) descreve que talvez o principal papel desempenhado por um diterpeno seja o das giberelinas, uma importante classe de hormônios vegetais responsável pela germinação de sementes, alongamento caulinar e expansão dos frutos de muitas espécies vegetais.

Os triterpenoides formam os componentes das resinas, látex, ceras e cutícula das plantas. Entre os triterpenos está uma importante classe de substâncias, tanto para vegetais quanto para animais; trata-se dos esteroides, os quais são componentes dos lipídios de membrana e precursores de hormônios esteroides em mamíferos, plantas e insetos. Outra classe importante de triterpenos são as saponinas que desempenham um importante papel na defesa contra insetos e microorganismos (PERES, 2004). São formados por 6 unidades de isopreno e apresentam estrutura do tipo C₃₀, policíclica, normalmente tetra ou pentacíclica, quase sempre hidroxilados na posição C-3. Já foram isolados mais de quatro mil triterpenoides naturais e identificados mais de quarenta tipos de esqueletos. Os triterpenos pentacíclicos são baseados em um esqueleto formado por 30 átomos de carbonos dispostos em cinco anéis de seis membros (ursano e gamacrano) ou quatro anéis de seis membros e um de cinco membros (lupano e hopano) (LUCETTI, 2010) (figura 7).

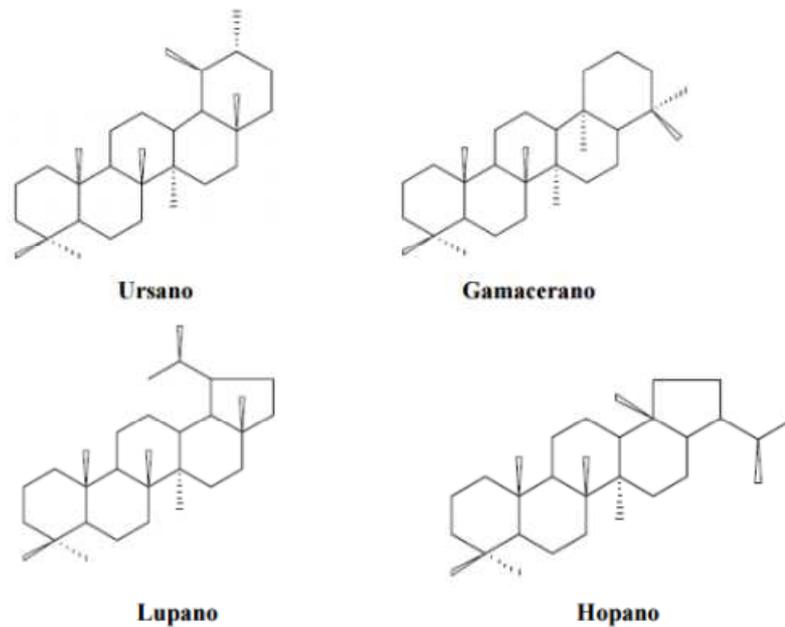


Figura 7: Estrutura química dos compostos fundamentais das principais famílias de triterpenos pentacíclicos (LUCETTI, 2010).

Quanto aos tetraterpenos, são uma classe de metabólitos que têm despertado grande interesse por parte dos pesquisadores devido a seu amplo espectro de atividade biológica, tais como anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antitumoral, antidiabética, antiulcerogênica, anticariogênica, hepatoprotetora, neuroprotetora, antiparasítica, analgésica e antioxidante. Como exemplos de tetraterpenos, podem ser citados os carotenoides, e as

xantofilas, pigmentos intimamente ligados aos processos fotossintéticos e especialmente, na pigmentação de flores e frutos (SILVA, 2013).

Existe ainda um grupo complexo de terpenos cujas moléculas são resultantes da síntese de mais de oito unidades de isoprenoides, ou seja, com mais de 40 carbonos na sua estrutura, estes são chamados de politerpenoides, que contêm compostos como coenzima Q10 ubiquinona, poliprenoides e polímeros longos encontrados, por exemplo, no látex (CROTEAU et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2003).

3.9.2.1. Lupeol:

Muitos centros de pesquisa têm concentrado seus estudos nas atividades biológicas dos derivados de lupano, em especial nas atividades anti-inflamatórias, antineoplásicas e antivirais. Os experimentos conduzidos usando vários modelos farmacológicos têm revelado que muitos desses compostos exercem uma significativa ação anti-inflamatória, a exemplo do ácido oleanólico e seus glicosídeos (SZAKIEL, et. al., 1995).

Dentre os derivados do lupano, um dos mais estudados é o lupeol. Esse triterpeno é encontrado em vegetais como repolho, pimentão, pepino, tomate, em frutas como a oliva, figo, manga, morango, uvas vermelhas e em plantas medicinais, como ginseng americano (SALLEM, 2009).

O lupeol (figura 8) possui descritas várias atividades farmacológicas, tais como antiofídica, hepatoprotetora, cardioprotetora, antitumoral e anti-inflamatória. Seu potencial anti-inflamatório em modelos experimentais, tanto *in vitro* quanto *in vivo* tem sido amplamente estudado (LUCETTI, 2010). Quanto à sua estrutura, a estereoquímica entre os anéis D/E é do tipo *tras* e seu quinto anel (E) é formado por cinco átomos de carbono (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Fernandez et. at.(2001), a aplicação tópica de lupeol nas doses 0,5 e 1,0 mg/orelha, reduziu significativamente o edema produzido por 12-o-tetradecanoil-formol acetato (TPA) no modelo de edema de orelha. No mesmo estudo a aplicação tópica de lupeol diminuiu de forma significativa os níveis de mieloperoxidase (marcador específico da atividade de neutrófilos), causando redução da infiltração de células em tecidos inflamados de camundongos.

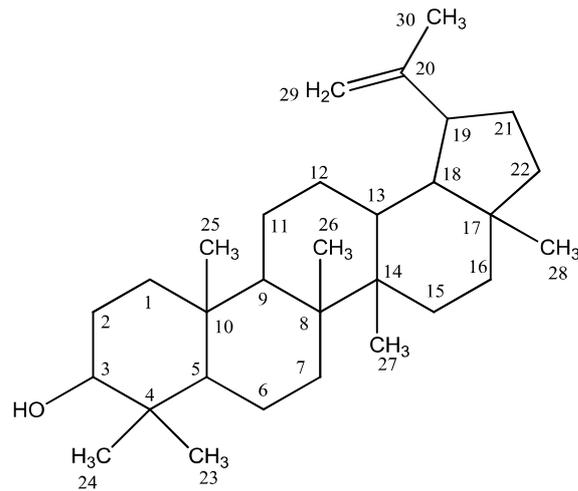


Figura 8: Estrutura química do triterpeno lupeol (DIAS, 2012).

3.9.2.2. α e β amirinas:

Os triterpenos α -amirina e β -amirina (figura 9), são derivados dos esqueletos ursano e oleanano, respectivamente. As agliconas do tipo β -amirina possuem duas metilas em C-20, já as do tipo α -amirina apresentam uma metila em C-20 e outra em C-19, com estereoquímica entre os anéis D/E na forma *cis* (OLIVEIRA, 2005).

Esses compostos assim como o lupeol são muito estudados devido às propriedades farmacológicas que possuem, tais como atividade anti-nociceptiva, anti-inflamatória, gastroprotetora, anti-fúngica e anti-bacteriana (OLIVEIRA, 2005).

De acordo com Mallavadhani et. al. (2004), os triterpenos lupeol, α -amirina e β -amirina exibiram potente atividade contra bactérias Gram-negativas (*Pseudomonas syringae*) e razoável atividade contra bactérias Gram-positivas (*Bacillus sphaericus* e *Bacillus subtilis*).

Ferreira et. al. (2000), demonstraram que o extrato metanólico de *Epidendrum Mosenii* exibiu uma acentuada atividade antinociceptiva frente a modelos de nocicepção química e térmica e que este efeito deve-se em parte, a participação do sistema opióide. Os princípios ativos implicados nessa atividade foram uma mistura dos triterpenos α -amirina e β -amirina.

Otuki et. al. (2005b), também descreveram o efeito anti-inflamatório tópico do triterpeno α -amirina em modelo de edema de orelha em camundongos.

Em estudo realizado por Meyer et al. (1982), o extrato obtido das folhas de *Sapindus saponária* L., rico em triterpenos pentacíclicos, dentre os quais destacam-se ácido

oleanólico, α -amirina e β -amirina, apresentou significativa atividade antiulcerogênica em modelos de piloro ligado em ratos, diminuindo o volume da secreção gástrica, a concentração de ácido clorídrico e o pH.

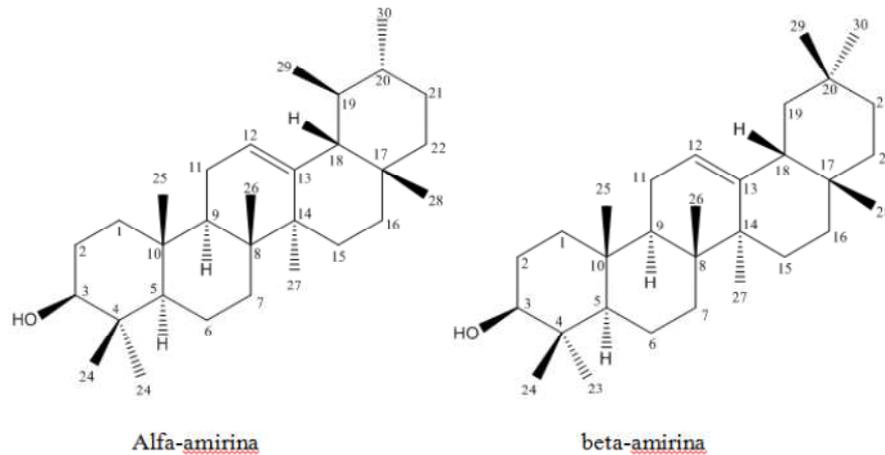


Figura 9: Estruturas químicas dos triterpenos α -amirina e β -amirina (OLIVEIRA, 2005).

3.9.3. Alcaloides: ocorrência, importância social e econômica:

Alcaloides são substâncias nitrogenadas na maioria das vezes farmacologicamente ativas encontradas predominantemente nas plantas Angiospermas, podendo ocorrer também em microorganismos e animais. Os alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros. Já os alcaloides com o átomo de nitrogênio não pertencente a um sistema heterocíclico são denominados de protoalcaloides, e alguns autores ainda classificam em pseudoalcaloides, substâncias que apresentam todas as características dos alcaloides verdadeiros, mas não são derivadas dos aminoácidos. Quase a totalidade dos alcaloides é derivada de aminoácidos e daí vem sua classificação. A partir dos aminoácidos alifáticos, têm-se os alcaloides pirrolidínicos e tropânicos (Ornitina) e os piperidínicos (Lisina), e dos aminoácidos aromáticos, têm-se os alcaloides isoquinolínicos (Tirosina) e os indólicos (Triptofano) (DEWICK, 1997; OLIVEIRA, 2008)

De acordo com Luca e Laflamme (2001): “20% das espécies de plantas conhecidas acumulam alcaloides, com maior frequência nas Dicotiledôneas”.

Essas substâncias podem ser encontradas em diferentes partes do vegetal. Em raízes de *Erythrina crista-galli* L., encontram-se os sedativos, hipertensivos, laxativos e diuréticos, eritralina (Figura 10A) e eritrinina (Figura 10B) (MAIER et al., 1999).

Nas folhas de *Catharantus roseus* são encontrados os alcaloides indólicos monoterpênicos ajmalicina (Figura 10C), um anti-hipertensivo e a serpentina (Figura 10D), um sedativo (SOTTOMAYOR et al., 2004).

Em geral os alcaloides são produzidos em um local da planta e armazenados em outro. Exemplo disto é a nicotina (Figura 10E) produzida nas raízes de *Nicotiana tabacum* e posteriormente translocadas para as folhas, onde é armazenada (PERES, 2005).

Alguns alcaloides podem ser encontrados em representantes de diversas famílias vegetais, como é o caso da camptothecina (Figura 10F), um importante agente anticancerígeno, que pode ser encontrado em *Camptotheca acuminata* (Nyssaceae), *Nothapodytes foetida*, *Pyrenacantha klaineana* (Icacinaceae), *Ophiorrhiza pumila* (Rubiaceae) e *Ervatamia heyneana* (Apocynaceae) (LORENCE e NESSLER, 2004). Este alcaloide é encontrado em todas as partes de *C. acuminata*, apresentando maiores níveis em folhas jovens (2-5 mg.g⁻¹ peso seco), 50% a mais do que nas raízes e 250% a mais do que na casca do caule (LORENCE e NESSLER, 2004; OLIVEIRA, 2008).

Para detecção da presença de alcaloides em espécies vegetais são realizados testes qualitativos e quantitativos. Na presença de reagente de Dragendorff, de Mayer e de Bertrand ocorre a precipitação desses alcaloides quando estão presentes. Assim como reações de coloração com cloreto férrico, com reativo Vitali-Morin (alcaloides tropanicos) ou de Urk – alcaloides indólicos (SIMÕES, 2004; MESSIADES, 2014).

Para determinação do teor de alcaloides totais, o ensaio descrito por Sreevidya (et al., 2003), consiste na precipitação dos alcaloides pela ação do reagente de dragendorff em meio ácido, com posterior tratamento deste precipitado com sulfeto dissódico, seguida de ressuspensão em ácido nítrico e adição de tiouréia. A absorvância da solução resultante é então comparada à curva de calibração construída com padrão nitrato de bismuto pentahidratado.

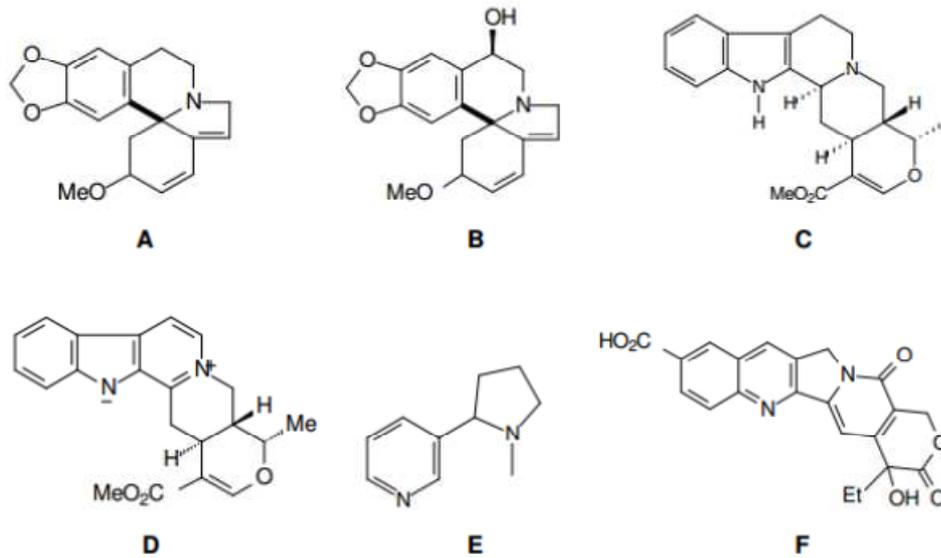


Figura 10: Alcaloides de raízes, folhas e cascas do caule. (OLIVEIRA, 2008)

Essa classe de substâncias do metabolismo secundário é famosa pela acentuada ação sobre o sistema nervoso central. A sociedade moderna tem feito usos diversos dessas substâncias, tanto de forma lícita como a utilização da nicotina (Figura 10E) e mesmo ilícita como os entorpecentes comercializados pelo narcotráfico como o LSD (Figura 11A) (dietilamida do ácido lisérgico) e a cocaína (Figura 11B) (OLIVEIRA, 2008).

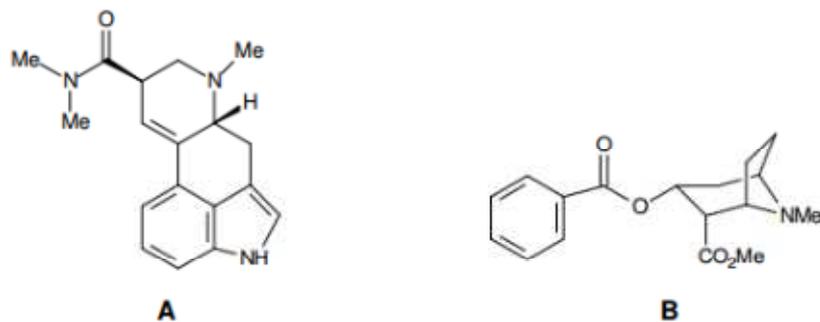


Figura 11: Alcaloides de importância social e econômica. (OLIVEIRA, 2008)

Na antiguidade há referências do uso dessa classe de substâncias na execução do filósofo grego Sócrates, condenado à ingerir cicuta (*Conium maculatum*), fonte do alcaloide coniina (Figura 12A). Os romanos também utilizavam os alcaloides hiosciamina (Figura 12B), e atropina (Figura 12C), derivados da *Atropa belladonna*, em homicídios. Outras

civilizações antigas ainda usavam alcaloides para o envenenamento de setas empregadas em caçadas e guerras, como o extrato do curare (*Chondodredron tomentosum*), produtor do alcalóide tubocurarina (Figura 12D) e da estricnina (Figura 12E) extraída de *Strychnos nuxvomica* (PERES, 2005).

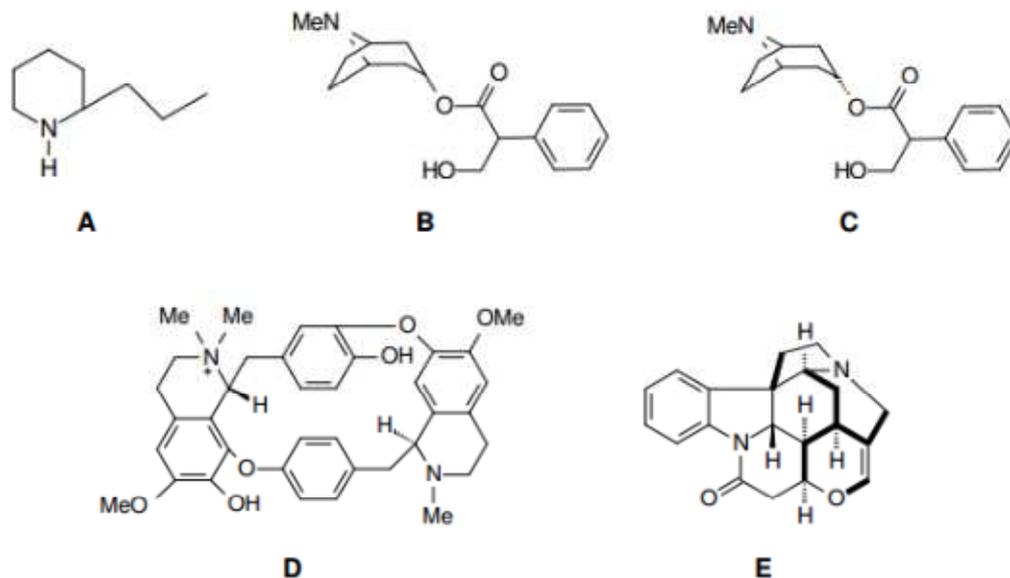


Figura 12: Alcaloides de importância histórica. (OLIVEIRA, 2008)

3.9.4. Alcaloides de maior prevalência na espécie *A. pyrifolium* Mart.

3.9.4.1. Alcaloides indólicos:

De acordo com Dewick (1997): “São alcaloides derivados do ácido aminado triptofano, que contém um sistema de anel indólico, originado na rota do ácido chiquímico via ácido antranílico. Ele atua ainda como o precursor de uma grande variedade de outros alcaloides, além dos indólicos, pode sofrer rearranjos que promovem a conversão do sistema de anel indólico em quinolínico”.

3.9.4.2. Alcaloides indólicos simples:

Este tipo de alcaloide é formado por modificação simples do L-triptofano, dando origem à triptamina por reação catalisada pela enzima triptofanod Descarboxilase e aos derivados N-metil e N,N-dimetil, largamente distribuídos em muitos vegetais, como, por exemplo, derivados hidroxilados, como o 5- hidroxitriptamina (serotonina) (Figura 13A),

encontrado em tecidos de mamíferos onde age como neurotransmissor no sistema nervoso central. Uma série de reações de descarboxilação e hidroxilação do L-triptofano dá origem à psilocina (Figura 13B) e psilocibina (Figura 13C) substâncias detentoras de propriedades alucinógenas. Uma via biossintética que cliva dois átomos de carbono produz ainda o alcaloide gramina (Figura 13D) (MUSTCH, 2003; OLIVEIRA, 2008).

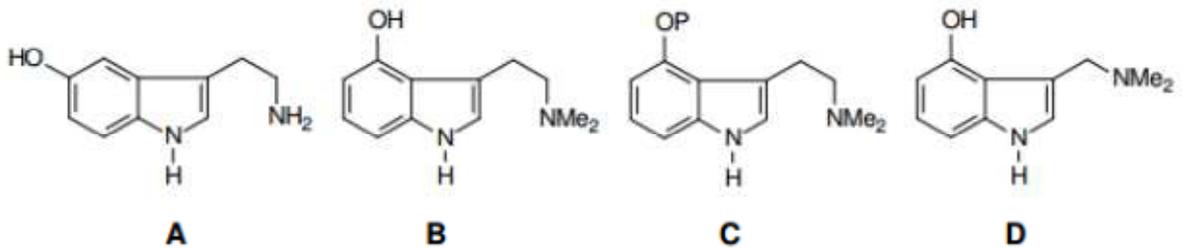


Figura 13: Alcaloides Indólicos simples (OLIVEIRA, 2008)

3.9.4.3. Alcaloides indólicos monoterpênicos:

Esta classe de alcaloides possui uma origem biossintética comum, o precursor estrictosidina, glicosídeo formado a partir da condensação da triptamina com o aldeído monoterpênico secologanina (Figura 14). Esta reação é catalisada pela enzima estrictosidina sintase. Os alcaloides indólicos monoterpênicos constituem o maior grupo de alcaloides em plantas, podem ser encontrados em cerca de oito famílias, dentre as quais a Apocynaceae, Loganiaceae e Rubiaceae (BRUNETON, 1999).

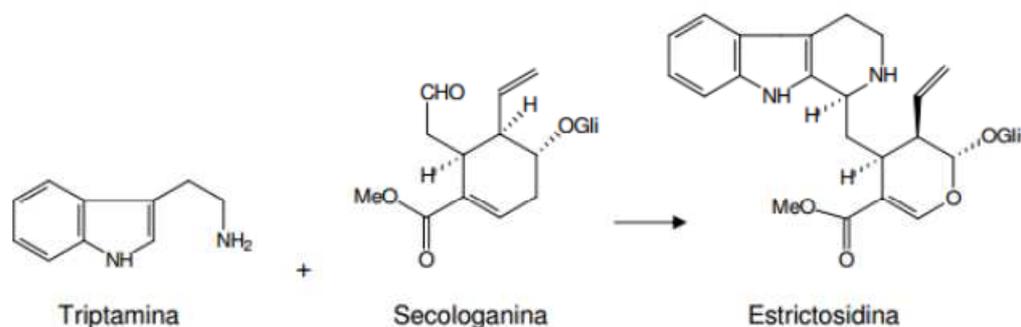


Figura 14: Reação de obtenção da estrictosidina (OLIVEIRA, 2008).

Rearranjos na parte terpenoídica da strictosidina leva à formação de subclasses (Figura 15) (BRUNETON, 1999 e ZENK, 1980).

I - Alcaloides em que a unidade monoterpênica não sofreu rearranjos [esqueletos corinanteano (a) ou estricnano (b)];

II - Alcaloides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-20 da unidade monoterpenoídica (esqueleto aspidospermano);

III - Alcaloides com rearranjo nos carbonos C-17 e C-14 da unidade monoterpenoídica (esqueleto ibogano).

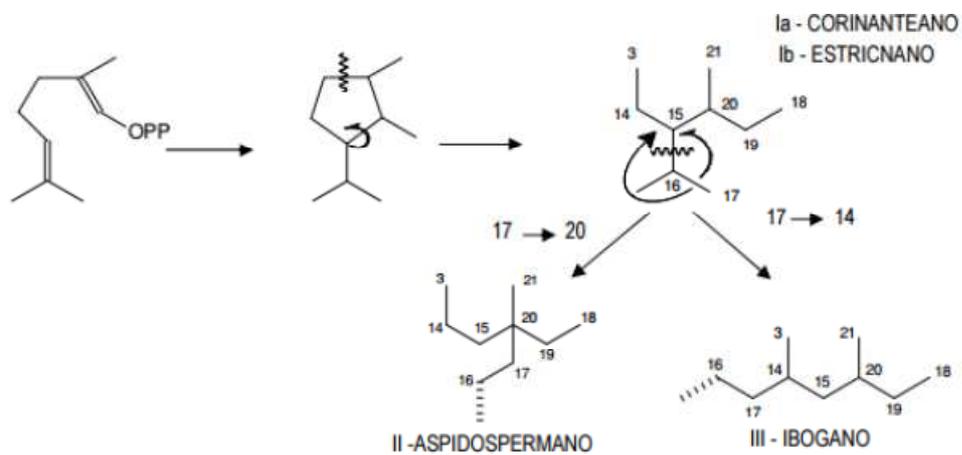


Figura 15: Esquema das reações na cadeia terpenoídica (OLIVEIRA, 2008).

Estas subclasses são ainda subdivididas em 9 tipos principais às quais se adicionam os bis-indólicos que são alcaloides diméricos (Figura 16).

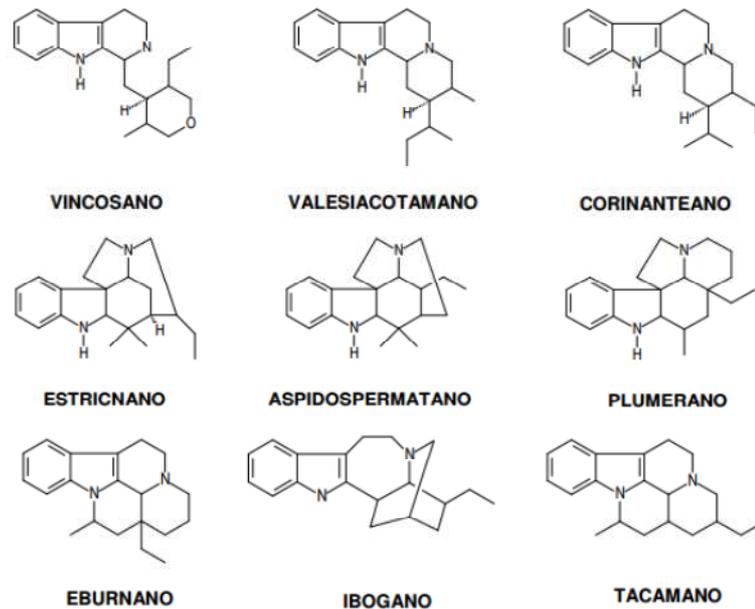


Figura 16: Esqueletos básicos dos alcaloides indólicos monoterpênicos. (OLIVEIRA, 2008).

3.10. O processo inflamatório

De acordo com Morrow e Roberts II (2007): “os quatro primeiros sinais da inflamação foram descritos por Celsius, um escritor romano do século I (d.C.), que relatou sobre o aumento do fluxo sanguíneo e a dilatação dos pequenos vasos (rubor), a permeabilidade vascular aumentada (edema), que levaria a uma elevação na temperatura local (calor), à passagem de células do sangue circulante e dor local (dor)”. A perda da função, quinto sinal da inflamação foi relatada posteriormente (AQUINO, 2010).

A resposta do organismo na tentativa de restabelecer a homeostase frente a um estímulo lesivo é o que constitui um processo inflamatório (RANG, 2007; AQUINO, 2010). Essa resposta é na maioria das vezes benéfica, e quando ausente pode colocar em risco a saúde do indivíduo (VODOVOTZ et al., 2008). Isso envolve uma série de eventos que podem ser causados por inúmeros estímulos, a exemplo de agentes infecciosos, lesão térmica, reações antígeno-anticorpo ou respostas a estímulos físicos (MORROW E ROBERTS II, 2007).

Esses eventos podem ser agudos ou crônicos e quando prolongados podem induzir, manter ou agravar muitos transtornos, necessitando do auxílio de agentes com propriedades

anti-inflamatórias, que possam auxiliar no tratamento de determinada enfermidade (SOSA, 2002, AQUINO, 2010).

O processo inflamatório pode ser a causa de inúmeras patologias, desde as mais simples até doenças como diabetes, câncer e doenças cardiovasculares (LUCAS et al., 2006), e é a mobilização endógena dos diversos mediadores que são liberados localmente que provoca os sinais e sintomas inerentes a esse processo (DI ROSA et al., 1971; DREUX, 2005).

A resposta inflamatória geralmente ocorre em tecido conjuntivo vascularizado, inclusive no plasma, células circulantes, vasos sanguíneos e componentes extracelulares (COTRAN et al., 1996).

A primeira fase a inflamação (fase aguda) é onde ocorre os fenômenos vasculares e celulares descritos abaixo segundo Albertine (2001):

I - Alterações de fluxo na microcirculação, levando a vasodilatação das arteríolas;

II - Aumento da permeabilidade vascular e formação de exsudato rico em proteínas, causando edema local;

III – Migração de leucócitos polimorfonucleares para o local da lesão.

Todo esse processo ocorre por estímulos dos mediadores inflamatórios. Tais mediadores podem ser produzidos no plasma, células ou tecidos agredidos. Entre eles destacam-se: histamina, cininas plasmáticas (bradicinina), serotonina, prostaglandinas, elementos ativados pelo sistema complemento, proteases neutras, produtos oriundos da fibrina (PDF), citocinas, entre outros (ALBERTINE, 2001).

O acúmulo de leucócitos polimorfonucleares no local da lesão depende de uma sequência de eventos, que compreendem a marginação, adesão, migração em direção ao estímulo quimiotático, fagocitose e degradação intracelular do agente lesivo, levando também à liberação extracelular de produtos de leucócitos (Figura 17) (CONTRAN et al., 1989).

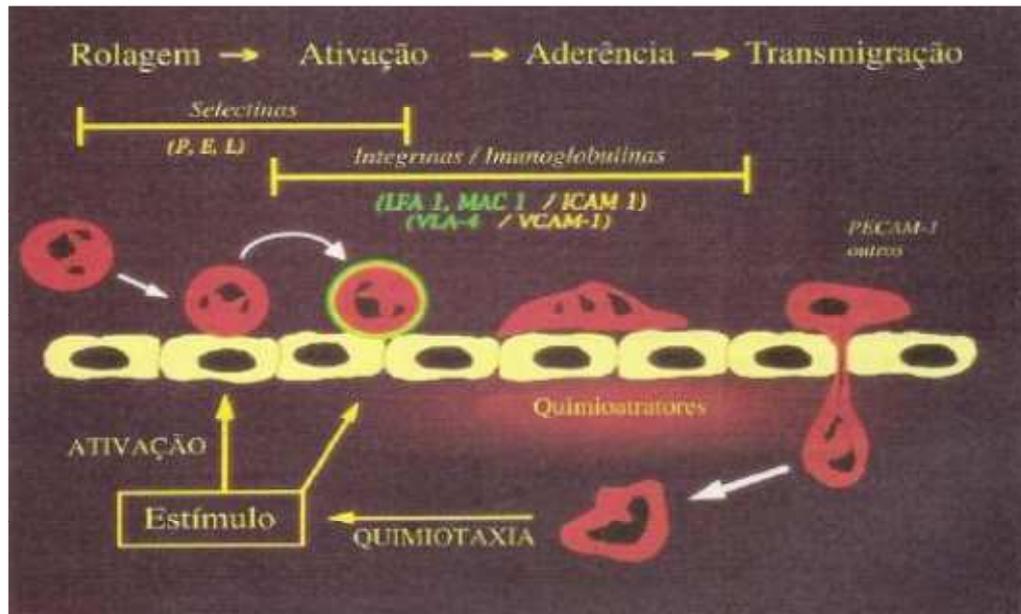


Figura 17: Sequencia de eventos leucocitários na inflamação (DREUX, 2005).

O exsudato inflamatório é um limitante ao agente lesivo, por ser constituído de anticorpos, fatores do complemento e outras macromoléculas, que modulam a resposta inflamatória (MONTENEGRO et al., 1999; DREUX, 2005).

Estudos histológicos mostram casos de inflamação exudativa aguda com predomínio de infiltração de neutrófilos, seguida de fase crônica, caracterizada por proliferação de células fibrosas, formação de vasos sanguíneos e infiltrado de células mononucleares (SILVA, 1986; GARCIA e LEME, 1979; DREUX, 2005).

Os mediadores inflamatórios podem ser de origem plasmática ou tecidual. Atuam como mensageiros químicos com ação nos vasos sanguíneos e/ou células, provocando sintomas e sinais inerentes à inflamação, como: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, opsonização, quimiotaxia, destruição de tecidos, dor, febre, etc (DREUX, 2005).

Mediadores plasmáticos:

- Sistema das cininas;
- Sistema complemento (C3a, C5a, C5b-C9);
- Sistema de Coagulação;
- Sistema fibrinolítico.

Mediadores teciduais:

- Aminas vasoativas: histamina e serotonina (mastócitos e plaquetas);

-Derivados do ácido aracídico (fosfolípidos de membrana): prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos;

-Enzimas lisossomais (neutrófilos e mastócitos);

-Metaloproteínas de matriz;

-Radicais livres derivados de oxigênio leucócitos;

-Fator de agregação plaquetária – PAF;

-Citocinas (macrófagos e linfócitos ativados);

-Óxido nítrico;

-Fatores do crescimento

O ácido aracídico pode produzir mediadores inflamatórios a partir de duas vias: vias da cicloxigenase (COX) e via da lipoxigenase. Os prostanoídes, incluindo prostaglandinas e tromboxano A_2 são produzidas através enzima cicloxigenase (Figura 18) (YOSHKAI, 2001).

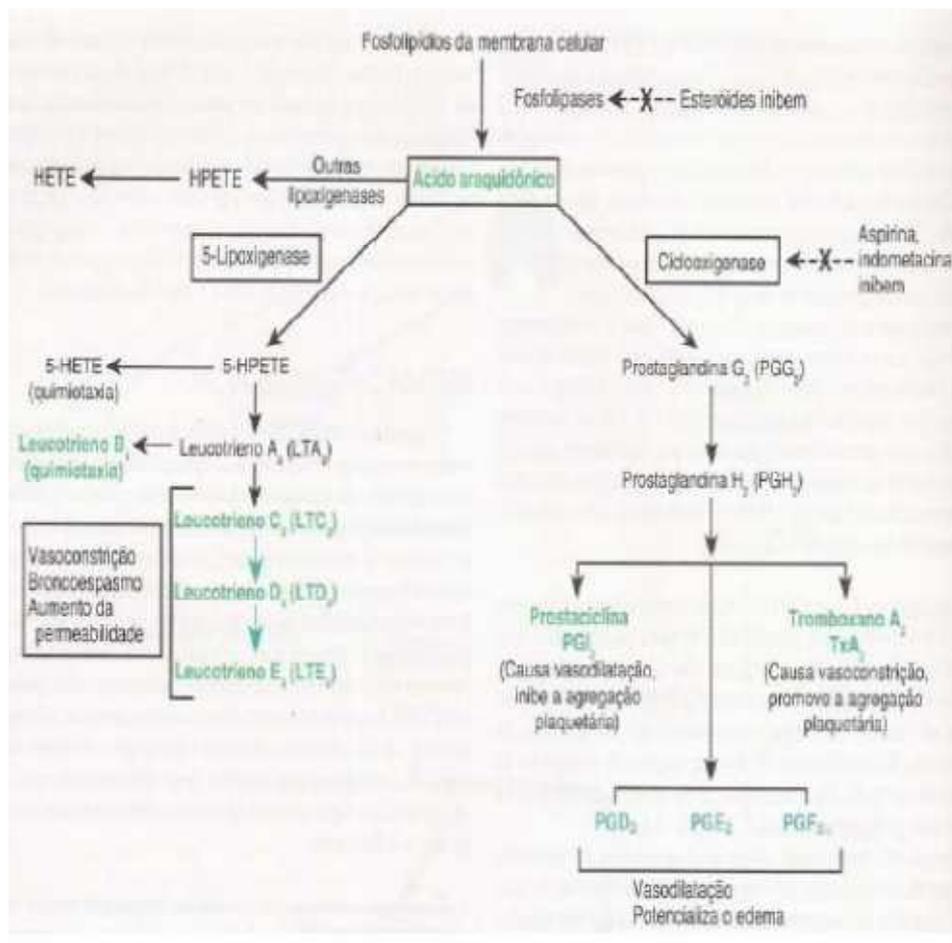


Figura 18: Geração de metabólitos do ácido aracídico e seus papéis na inflamação

(COTRAN et al., 2002)

A via da cicloxigenase produz prostaglandinas como PGE₂ (participa de reações alérgicas), PGP₂, PGF_{2α}, PGI₂ (prostaciclina) e tromboxanos (TxA₂) (COTRAN et al., 1996; WHITE, 1999).

Até 1971 somente uma COX havia sido descrita. No início da década de 90 a isoforma COX-2 foi descoberta. A enzima COX-1 é constitutivamente expressa, já a COX-2 é expressa sob circunstâncias específicas, principalmente em processos inflamatórios. Após uma década, a terceira isoforma foi descoberta e chamada de COX-3, que é mais abundante no coração e córtex cerebral (XIE et al., 1991; MARCHESLI e BAZZAN, 1996; CHANDRASEKHERAN et al., 2002; AQUINO, 2010).

Na via da lipoxigenase a 5-lipoxigenase é a enzima predominante de neutrófilos, dando origem ao principal produto a HEPE, que por sua vez dá origem aos leucotrienos. O leucotrieno LTB₄ é um importante mediador da aderência de células ao endotélio. Os leucotrienos LTC₄, LTD₄ e LTDC₄, causam vasoconstrição, broncoespasmos e aumento da permeabilidade vascular (SIQUEIRA e DANTAS, 2000).

Os tromboxanos (ex. TxA₂), contribuem no processo de coagulação sanguínea (BAZAN e FLOWER, 2002).

A histamina é uma amina vasoativa que, após liberação atuam em receptores histamínicos H₁. Em concentrações menores causa prurido e em maiores quantidades provoca hiperalgesia e dor. (DRAY, 1995).

A serotonina é outra amina vasoativa muito importante que provoca agregação plaquetária através de receptores 5-HT_{2A}, causando também vasodilatação quando o endotélio está intacto. Se houver lesão no endotélio, a mesma causa constricção e prejudica ainda mais o fluxo sanguíneo (KANG et al., 2007).

A bradicinina é uma cinina que age em receptores beta -1 e beta-2 e provoca vasodilatação, permeabilidade vascular e estimulação de células do sistema imune e neurônios sensoriais. Está relacionada com processos de injúria tecidual (TDGUI e MALLA, 2001).

O óxido nítrico (NO) por sua vez promove relaxamento da musculatura lisa, reduz a agregação plaquetária e é citotóxico contra agentes lesivos. É produzido por células do endotélio por estímulo de citocinas como MCP-1, IL-6, M-CSF, ICAM-1 e VCAM-1 (TDGUI e MALLA, 2001).

A citocinas pro-inflamatórias são peptídeos sintetizados por monócitos e linfócitos. Dentre as principais estão: interleucina 1 (IL-1) E fator de necrose tumoral (TNF)

(MONTENEGRO, 1999). Interleucinas 1 e 6 e TNF-alfa possuem papel importante tanto na indução da inflamação local, como também, na indução da febre. Isso promove uma defesa ao agente infeccioso (ex. bactérias), por vários dias (YOSHIKAI, 2001).

Outro importante mediador inflamatório é a substância P, um dos neuropeptídeos mais estudados, sendo liberado sob vários estímulos nocivos. Acredita-se que exerça função através de modulação específica de receptores NK1 (SNIJDELAAR et al., 2000). Pode interagir com outros componentes da transmissão da nocicepção, aumentando respostas a aminoácidos como aspartato e glutamato na região dorsal da medula espinhal (SNIJDELAAR et al., 2000).

3.11. Fisiopatologia da dor:

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão” (OLINDA, 2010).

Essa sensação desagradável é inerente a cada indivíduo. É a resposta a um estímulo nocivo, o qual é sinalizado pelo organismo como um alerta à saúde dos órgãos e tecidos. Quando ocorre de maneira rápida (dor aguda) é provocada por estímulos mecânicos e/ou térmicos, enquanto que, a dor lenta envolve tanto estímulos mecânicos e térmicos como também estímulos químicos (RUOFF e LEMA, 2003; GUYTON e HALL, 2002). A dor lenta, também chamado de dor crônica, pode muitas vezes ocorrer de uma injúria ou processo inflamatório difícil de ser identificado (WANG e WANG, 2003). Esse processo até certo ponto é de grande importância para a manutenção da homeostasia do indivíduo e da sua relação com o meio (PIRES, 2007; OLINDA, 2010).

A dor aguda na maioria das vezes está relacionada com lesão recente, ativando nociceptores no local da lesão e pode desaparecer antes da cura do dano tecidual (AQUINO, 2010). Já a dor crônica pode permanecer por mais tempo (meses ou anos), podendo afetar de maneira física, comportamental ou psicológica a saúde do indivíduo (AQUINO, 2010).

O fenômeno da dor apresenta dois componentes importantes de acordo com Ramadabran e Bansinath (1996): “o sensorial e o emocional/afetivo. O componente sensorial corresponde ao mecanismo neurofisiológico e permite a transmissão e interpretação do estímulo nocivo através da ativação de receptores. Enquanto que, o componente emocional é a percepção do estímulo doloroso”.

De acordo com o tipo de lesão e seus mediadores, a dor pode ser classificada em:

- Nociceptiva: na qual um grande número de nociceptores (receptores para a dor) são estimulados. Pode ocorrer por estimulação química ou física de terminações nervosas normais, e pode ser uma resposta a danos teciduais, como inflamação, traumas, isquemias, etc (RANG e DALE, 2007);

-Neuropática: pode ocorrer quando há disfunção de algum nervo. É resultante de um dano (alguma doença), que envolva regiões do Sistema Nervoso Central e/ou da Medula Espinhal. Indivíduos que sofrem de dor neuropática podem sentir manifestações dolorosas originadas de algumas desordens como: hiperalgesia (sensibilidade exacerbada a um estímulo doloroso); alodina (dor em resposta a estímulos não dolorosos) e hiperestasia (sensibilidade anormal a um estímulo sensorial) (BESSON e CHAOUCH, 1987; DRAY et al., 1994; AQUINO, 2010);

- Psicogênica: dor associada a fatores psicológicos (AQUINO, 2010).

Quando é de origem inflamatória, a dor pode ser caracterizada pela presença de mediadores químicos, que tem o potencial de diminuir o limiar dos nociceptores, ativando os receptores, ou ambos, a depender do tipo de substância liberada (AQUINO, 2010 apud FERREIRA et al., 1993).

Durante a modulação da dor a estímulos térmicos, mecânicos e/ ou químicos, as terminações nervosas periféricas das fibras nociceptivas sensoriais viscerais e somáticas aferentes sofrem alterações de modo que, os canais iônicos/receptores, sofrem mudanças na conformação e medeiam a despolarização para que inicie um potencial de ação e os axônios aferentes primários possam conduzir a informação das terminações periféricas para o sistema nervoso central (Figura 19) (GOLAN, KUBITZKI e MESQUITA, 1978).

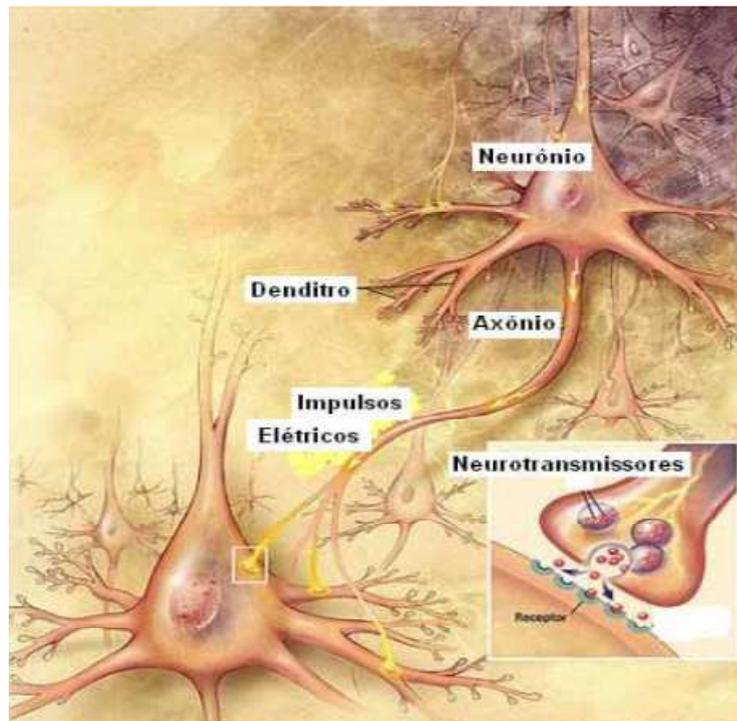


Figura 19: Visão Geral do mecanismo da dor (AQUINO, 2010).

Os nociceptores são continuidade de fibras aferentes sensitivas, principalmente dos tipos A-delta [participam da fase primária da dor (dor rápida) e respondem a estímulos provocados por frio, calor e mecanismos de alta intensidade, conduzindo-os com velocidade intermediária] e C [participam da fase secundária da dor (dor difusa), conduzindo com baixa velocidade os estímulos de calor, temperatura morna e estímulos mecânicos intensos ou irritantes]. Ambas as fibras A-delta e C, terminam nas lâminas mais superficiais do corno dorsal (AQUINO, 2010). As fibras A-delta estão localizadas na pele e membranas mucosas e as fibras C estão largamente distribuídas nos tecidos e na pele (CARVALHO e VIANNA, 1994). Existem ainda as fibras $A\beta$, que são de grande diâmetro, sendo capazes de conduzir rapidamente o estímulo doloroso, respondendo a estímulos periféricos semelhantes. A maioria dessas fibras, originárias de neurônios cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios das raízes medulares dorsais, faz sinapses com neurônios secundários do corno da medula dorsal (BESSON, 1987; MILLAN, 1999).

Quando o potencial de ação é gerado nos aferentes primários, induzem a liberação de neurotransmissores ao alcançar as terminações axônicas centrais do corno dorsal da medula espinhal. Contudo, a transmissão sináptica no corno dorsal entre os aferentes primários das fibras C e os neurônios de projeção secundários, possuem substâncias de ação rápida (ex. glutamato), neuropeptídeos (ex. substância P) e neuromoduladores) (AQUINO 2010).

Dentro desse contexto, a transmissão sináptica realizada na medula espinhal é regulada por interneurônios inibitórios locais e projeções que descem do tronco encefálico até o corno dorsal. Existem mecanismos de regulação ascendente e descendente da transmissão dos estímulos nociceptivos determinando a intensidade da dor. A regulação ascendente age na transmissão periférica para o cérebro (Figura 20), já a descendente pode controlar a transmissão no sentido inverso (JOHNSON, 2000; BASBAUM et al, 2009).

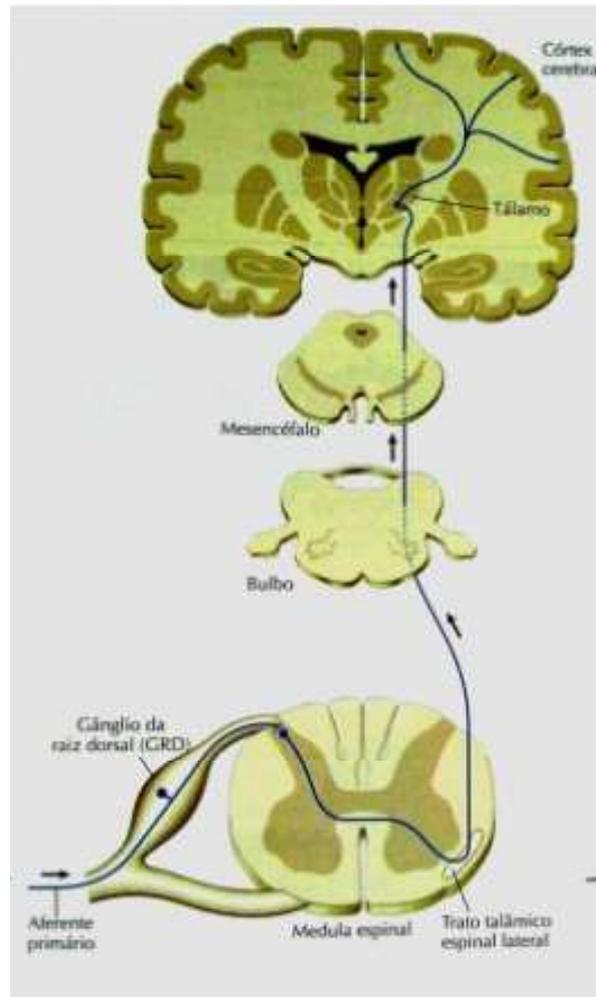


Figura 20: Transmissão nervosa ascendente realizada durante o estímulo para a dor (BEYZAROV, 2006).

Várias substâncias neurotransmissoras são responsáveis pela modulação da atividade nociceptiva, como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicinas [substância P (SP), neurocinina A (NKA) e neurocinina B (NKB)], peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (Calcitonin Gene-Related Peptide - CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), galanina, encefalinas e endorfinas

(WOOLF, 1994; CAO et al, 1995; MILLAN, 1999; VITOR et al, 2008). Esses sistemas por sua vez podem limitar a transferência de informação no estímulo da dor para o cérebro, constituindo alvos para intervenção de muitos estudos farmacológicos (GOLAN et al., 1978).

3.11.1. Mediadores da dor

Vários mediadores químicos estão envolvidos no processo da dor, dentre eles a interleucina IL-1beta, que é produzida no tecido inflamado. As células que formam a barreira hematoencefálica reconhecem essa interleucina quando a mesma é liberada na corrente sanguínea. Subsequentemente, a IL-1beta expressa duas enzimas: a COX-2 e PGE₂-sintase (EK et al., 2001). Estas por sua vez vão gerar a formação de PGE₂, que irá ativar receptores que levarão à transmissão do estímulo doloroso até o cérebro (BARTIFAI, 2001).

Algumas substâncias químicas que surgem no processo de nocicepção em decorrência de inflamações com ação local são: bradicinina, serotonina, histamina e produtos derivados prostanoídes. Outros são produzidos no corpo neuronal para a periferia (substância P e CGRP) (MARQUES, 2004). Estes últimos (SP e CGRP) aumentam o edema inflamatório, atuando diretamente sobre as vênulas, causando vasodilatação, contribuindo para a liberação de histamina pelos mastócitos e para a hiperalgesia (AQUINO, 2010).

O trifosfato de adenosina (ATP) pode estar presente na dor transiente, quando na presença de lesão tecidual (BEAN, 1990; AQUINO, 2010).

A bradicinina é um dos agentes mais ativos para a dor, pois ativa de forma direta as fibras A-delta e C e aumentam a síntese e liberação de prostaglandinas (BASBAUN e JESSEL, 2004).

Essa grande quantidade de mediadores químicos leva a redução do limiar de sensibilidade das terminações nervosas vizinhas, estando relacionados com regiões não envolvidas pelo estímulo inicial (MARQUES, 2004).

3.12. O uso de modelos animais como ferramenta na pesquisa de novos fármacos:

Tendo em vista que os atuais anti-inflamatórios, bem como os analgésicos utilizados para o tratamento de patologias agudas e crônicas apresentam muitos efeitos colaterais, devido suas ações sobre os diversos sistemas, são intensas as pesquisas realizadas na

atualidade em busca de novas drogas que possuam menos efeitos adversos e uma maior eficácia (OLINDA, 2010).

As metodologias farmacológicas e toxicológicas (a experimentação animal, propriamente dita) se baseiam na observação dos efeitos de substâncias sobre organismos vivos, para a qual o experimentador se vale de técnicas fisiológicas ou bioquímicas. Por meio dessas observações, podem ser obtidos dados qualitativos ou quantitativos sobre a ação de medicamentos ou substâncias (PRESGRAVE, 2002).

O desenvolvimento de novas terapias e drogas sempre depende do modelo animal apropriado para uma determinada atividade biológica (ALBERTINE, 2001).

Do ponto de vista laboratorial, existem diversos métodos experimentais empregados na investigação dos processos inflamatórios. Esses métodos são bastante variáveis e analisam alguns aspectos do processo inflamatório (GARCIA LEME, 1979), como:

- os fenômenos dolorosos, sua origem, produção e mecanismos;
- os fenômenos vasculares precoces, dilatação, alterações do fluxo, dinâmica circulatória;
- alterações de permeabilidade vascular;
- desenvolvimento de edemas;
- pesquisa de fatores quimiotáticos e seus mecanismos;
- processos fagocitários;
- análise química e farmacológica de exsudatos inflamatórios e perfusatos de áreas inflamadas, para detecção de substâncias ativas (mediadores e enzimas);
- Alterações no sistema linfático: composição e fluxo de linfa;
- Alterações morfológicas globais, natureza das células presentes, a extensão do infiltrado celular e lesão final;
- os processos cicatriciais (DREUX, 2005).

REFERÊNCIAS:

AKERELE, O. **Fitoterapia**, 5 ed., p. 355-363, 1998.

ALBERTINE, R. Análise do efeito do laser de Baixa Potência (AS-GA-AI) em Inflamação aguda. **Dissertação de Mestrado. Instituto** de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, 2001.

ALLEN, J.R.F; HOLMSTEDT, B.R. (1980) The simple beta-carboline alkaloids. **Phytochemistry**, v.19, p.1573-1582, 1980.

ALMEIDA, L. A. Determinação de taninos em extratos de casca de banana. **Trabalho de Conclusão de Curso**. Poços de Caldas, 2014.

ALMEIDA, M. Z. Plantas Mediciniais. **Universidade Federal da Bahia**. 3 Ed. Salvador, 2011.

ALVES, R. R. N.; SILVA, C. C.; ALVES, H. N. Aspectos socioeconômicos do comércio de plantas e animais em áreas metropolitanas do norte e nordeste do Brasil. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 8, n. 1, p. 181-189, 2008.

ANDERSON, R. F.; AMARASINGHE, C.; FISHER, L.J.; MAK, W.B.; PACKER, J.E. Reduction in freeradical- induced DNA strand breaks and base damage through fast chemical repair by flavonoids. **Free Radic. Res.**, v.33, n.3, p.91-103, 2000.

AQUINO, A. B. Avaliação do perfil anti-inflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum*. **Dissertação de Mestrado**, UFA, Marceió, 2010.

ARAÚJO JR., J. X.; ANTHEAUME, C.; TRINDADE, R. C. P.; SCHMITT, M.; BOURGUIGNON, J.; SANT'ANA, A. E. G. Isolation and characterisation of the monoterpenoid indole alkaloids of *Aspidosperma pyriformium*. **Phytochemistry**, v. 6, p. 183-188, 2007.

ARAÚJO, J. M. A. **Química de Alimentos: teoria e prática**, 3º Ed., Universidade Federal de Viçosa, 2004.

ARNDT, R. R.; BROWN, S. H.; LING, N. C.; ROLLER, P.; DJERASSI, C.; FERREIRA-FILHO, J. M.; GILBERT, B.; MIRANDA, E. C.; FLORES, S. E.; DUARTE, A. P.; CARRAZZONI, E. P.; **Phytochemistry**, v. 6, p. 1653, 1967.

ASSIS, T. S.; MEDEIROS, R. M. T; ARAÚJO, J.A. S; DANTAS, A. F. M.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano. **Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 29, n. 11, p. 919-924, 2009.

BARBOSA, M. M. Obtenção de carotenoides e flavonoides a partir do bagaço do pedúnculo de caju por maceração enzimática. **Dissertação de Mestrado**, Fortaleza-CE, 2010.

BARROS, S. B.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J.A. O. (Org.). **Fundamentos de toxicologia**. Atheneu, 2 ed., p. 57-68, São Paulo, 2003.

- BARTIFAI, T. Telling the brain about pain. **Nature**, v. 410, p. 425-427, 2001.
- BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M.; Percepção da dor. **Princípios da Neurociência**, 4 Ed., Manóelle, SP, 2004.
- BATISTA, L. M.; VALENÇA, A. M. A Fitoterapia no Âmbito da Atenção Básica no SUS: Realidades e Perspectivas. **Revista de Pesquisa Brasileira de Odontopediatria Clínica Integrada**, v. 12, n. 2, p. 293-96, João Pessoa, 2012.
- BAZAN, N. G.; FLOWER, R. L. Lipid signals in pain control. **Nature**, v. 420, p. 135-138, 2002.
- BEAN, B. P. ATP-activated channels in rat and bullfrog sensory neurons: concentration dependence and kinetics. **Journal of Neuroscience**, v. 10, p. 1-10, 1990.
- BESSON, J.M.; CHAOUCH, A. Peripheral and spinal mechanisms of nociception. **Journal of Physiology**, v. 67, p. 67-186, 1987.
- BEYZAROV, E.P.; RAWLS, S.M.; RAFFA, R.B. **Atlas de Farmacologia de Netter**. 1 Ed. Artmed, Porto Alegre, 2006.
- BIEL, J. H.; DRUKKER, A. E.; MITCHELLI, T. F.; SRENGELERP, E. P.; NUHER, P. A.; CONWAY, A. C.; HORITA A. Central Stimulants. Chemistry and Structure-Activity Relationship of Arylalkyl Hydrazines. **Journal American Chemical Society**, v. 81, p. 2805, 1959.
- BITTENCOURT, C. M. S. Análise fitoquímica e farmacológica de plantas medicinais selecionadas da flora catarinense: *Aleurites moluccana*, *Bauhinia microstachya* e *Marrubium vulgare*. **Curso de pós-graduação em Química**, p. 03, Florianópolis-SC, 2003.
- BOBBIO, P.A.; BOBBIO, F.O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed., p. 103-118, São Paulo, Varela, 2001.
- BOLZANI, V. S.; SERUR, L. M.; MATOS, F. J. A.; BOTTLE, O. R.; **Biochemical Systematics and Ecology**, v.15, p.187, 1987.
- BOURDY, G. et al. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part VI. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by Isoceño-Guaraní Indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.269-77, 2004.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. **ESAM**, 3.Ed., p. 510, Fortaleza, 1976.
- BRASIL. Decreto Presidencial nº 5813, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2006.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Conferência Nacional de Saúde, VIII. Relatório Final. Brasília, DF, 1986. Disponível em:
http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/8_CNS_Relatorio%20Final.pdf.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da União**, n.84, p. 19, seção 1, 2006.

BRAZ-FILHO, R. Química de Produtos Naturais: Importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. **Revista Química Nova**. v. 17, p. 405 – 445, 1994.

BRITO, A. S. **Manual de Ensaio Toxicológicos *in vivo***. Editora da UNICAMP, Campinas, SP, 1994.

BRUNETON, J. Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants. 2. ed. Tradução de Hatton. C. K. London, **Lavoisier**, p. 1136, 1999.

CAMPBELL, D. G.; HAMMOND, H. D.; Floristic Inventory of Tropical Countries: The Status of Plant systematics, Collections, and Vegetation, plus Recommendations for the Future, **NY Botanical Garden**, New York, 1989.

CAO, C.; MATSUMURA, K.; YAMAGATA, K. Induction by lipopolysaccharide of cyclooxygenase-2 mRNA in rat brain. Its possible role in the febrile response. **Brain Research Bulletin**, v. 697, p. 187-196, 1995.

CARDOSO, I. N. Plantas tóxicas no perímetro urbano de Caxias, Maranhão. [**Monografia.**], **CESC-UEMA**, Caxias.: 2004.

CARNEIRO, F. M.; SILVA, M. J.P.; BORGES, L. L.; ALBERNAZ, C. L.; COSTA, J. D. P. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, UEG/Campus de Iporá, Dez. 2014.

CARVALHO, W.A.; VIANNA, W. Analgésicos Opióides. In: SILVA, P. **Farmacologia**, 4^a ed.: Guanabara Koogan,. p. 441-459, Rio de Janeiro, 1994.

CHANDROSERKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3 a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: conig, structure, and expression. **Proceeding of the national Academy of sciences**, v. 99, p. 13926-13931, USA, 2002.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil**, Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1926.

CORREA. M.P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil.**: IBDF, v.5, p. 687, Rio de Janeiro 1978.

COSTA, E. L. Análise toxicológica, citotóxica e mutagênica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyriforme* (APOCYNACEAE). **Dissertação de Mestrado**, Mossoró-RN, 2015.

COTRAN, R. M.; KUNAR, Y.; COLLISN, T. **Patologia Estrutural e Funcional**, 6 ed., Guanabara, RJ, 2002.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBLINS, S. L. **Pathologic bases of disease**, 4 ed., Philadelphia: Saunders, p. 39-71, 1989.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBLINS, S. T. **Patologia estrutural e funcional**, 5 ed., Guanabara Koogan, RJ, 1996.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, **Rockville: American Society of Plant Physiologists**, p.1250-1318, 2000.

DE LUCA, V.; ST PIERRE, B. The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis. **Trends in Plant Science**, v.5, p.168–173, 2000.

DEWICK, P.M. Medicinal natural products: A Biosynthetic Approach. **New York : John Wiley e Sons**, p. 466, 1997.

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, p. 297-298, 1971.

DIAS, J. F. G. Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (APOCYNACEAE), **Tese de Doutorado**, 2012.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Brazilian Journal Anesthesiology**, v. 75, p. 125-131, 1995.

DREUX, E. C. Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *Vernonia scorpioides* (Lam) Persoons em inflamação aguda. **Universidade do Vale do Paraíba**, São José dos Campos, SP, 2005.

DUARTE, A. P.; MIRANDA, E. C. Um novo alcaloide quaternario de *Aspidosperma gilbertii*. **An. Acad. Brasil. Ciênc.**v.55, p. 189, 1983.

DUTRA, F. L. G. Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistemas de estacionamneto natural acelerados. **Dissertação de Mestrado**, Curitiba, 2009.

EK, M.; ENGBLOM, D.; SAHA, S. et al. Inflammatory response- Pathway across the blood-brain barrier. **Nature**, v. 410,p. 430-431, 2001.

FAMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C; MACHADO, M. F. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. J. O. Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** , v. 18, n.4, p. 627-641, 2008.

FERNANDEZ, M. A.; DE LAS HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SAENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal Pharm. Pharmacol.**, v. 11, p. 1533-1539, 2001.

FERREIRA, I.C.P. *et al.* Anti-leishmanial activity of alkaloidal extract from *Aspidosperma ramiflorum*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 325-327, 2004.

FERREIRA, J.; FLORIANI, A. E.; FILHO, V. C.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. Antinociceptive properties of the methanolic extract and two triterpenes isolated from *Epidendrum Mosenii* (Orchidaceae). **Life Science**, v. 66, n. 9, p. 791-802, 2000.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. S. bradykinin cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 127, 1993.

FILGUEIRAS T. S.; PEIXOTO, A. L. Flora e vegetação do Brasil na carta de caminha. **Acta Botanica Brasilica**, v. 16, n. 3, p. 263-272, 2002.

FILHO, S. L. S. C. Efeito do teor de tanino do sorgo sobre a fermentação ruminal e parâmetros nutricionais dos ovinos. **Tese de Doutorado**. Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA I. M. O.; RODRIGUES R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Revista Multi Ciência**. Unicamp, 2006.

GARCIA LEME, J. Métodos experimentais no estudo da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 19, n. 5, p. 146-150, 1979.

GARCIA, M.; RUBEN, F.; BROWN, K. S.; **Phytochemistry**, v. 15, p. 1093, 1976.

GEISSMAN, T. A.; CROUT, D. H. G. Organic Chemistry of Secondary Plant Metabolism. **Freeman, Cooper & Company** 1 ed. San Francisco, 1969.

GILBERT, B. Um estudo fitoquímico do gênero *Aspidosperma*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 38, p. 315-319, 1966.

GIOGETTI, M. *et al.* Brazilian plants with possible action on the central nervous system—A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, 2007, p. 338–347.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOLAN, D. E. ; KUBITZKI, K.; MESQUITA, A. A. L. Chemosystematic implications of xanthenes in *Bonnetia* and *Archytaea*. **Biochemistry System Ecology**, v.6, p. 185, 1978.

GOMES, L. F. S.G. Abordagem fitoquímica, determinação da atividade antiplasmódica *in vitro* e avaliação preliminar da toxicidade do extrato hidroetanólico das cascas de

Aspidosperma excelsum Benth (Apocynaceae). **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Federal do Pará, Belém. 2011.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de Fisiopatologia médica**. Guanabara Koogan, 10 ed., p. 369-376, RJ, 2002.

HARBORNE, J. B. Classes and functions of secondary products, In: Walton NJ, Brown DE (Ed.). *Chemicals from plants, perspectives on secondary plant products*. **London: Imperial College**, p.1-25. 1999.

HENRIQUE, M.C.; NUNOMURA, S.M.; POHLIT, A.M. Alcalóides indólicos de cascas de *Aspidosperma vargasii* e *A. desmanthum*. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 284-287, 2010.

JÁCOME, R.L.R.P. *et al.* Estudo químico e perfil cromatográfico das cascas de *Aspidosperma parvifolium* A. DC. (“Pau pereira”). **Química Nova**, v.27, n.6, p. 897- 900, 2004.

JOHNSON, L. R. Fundamentos de fisiologia médica. P. **Guanabara Koogan**, 2ª Ed., p. 575-579, 2000.

KAM, T. S; IEK, I. H; CHOO, Y. M. Alkaloids from the stem-bark of *Alstonia macrophylla*. **Phytochemistry**, v. 51, p. 839–844, 1999.

LEAL, I. R.; TABARELLI, M.; SILVA, J. M. C. **Ecologia e conservação da caatinga**.: Ed. Universitária da UFPE, Recife, 2003.

LIMA, J. D. P. Composição química e avaliação das atividades antioxidantes, antimicrobiana e efeito inotrópico da entrecasca de *Aspidosperma pyriforme* Mart. **Dissertação de Mestrado**, 2014.

LIMA, L. R. P.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Efeitos do flavonóide quercetina e dos corantes bixina e norbixina sobre parâmetros sanguíneos de coelhos. **Revista de Nutrição**, v. 16, n.3, p.305-314, 2003.

LIMA, M. C. J. S. Análise fitoquímica e avaliação das atividades anti-inflamatória antipeçonhenta e citotóxica de extratos aquosos de *Aspidosperma pyriforme* e *Ipomoea asarifolia*. **Dissertação de Mestrado**, Natal, 2015.

LIMA, M. C. J. S.; SOTO BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyriforme* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**. v. 55, p. 320–324, 2010

LINS, F. S. V. Levantamento Etnobotânico das espécies vegetais cultivadas e utilizadas com fins medicinais no município de Cuité, Paraíba. **[Monografia]**, p. 16, Cuité- Paraíba, 2013.

LORENCE A., NESSLER, E. Molecules of interest. Camptothecin over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2735-2749, 2004.

LORENCE A; NESSLER, CL. Camptothecin, over four decades of surprising findings. **Phytochemistry**, v. 65, p. 2735–2749, 2004.

- LUCA, V.; LAFLAMME, P. The expanding universe of alkaloid biosynthesis. **Physiology and Metabolism**, n. 4, p. 225-233, 2001.
- LUCETTI, D. L. Avaliação das atividades anti-inflamatória e anti-nociceptiva de do acetato de lupeol isolado de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – Apocynaceae (Janaguba). **Dissertação de Mestrado** em Farmacologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2010.
- MAIA, G. N. Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades.: **D&Z Computação**, p. 413, São Paulo, 2004.
- MAIER, U. H.; ROLD, W.; DEUS-NEUMANN, B; ZENK, M. H. Biosynthesis of Erythrina alkaloids in *Erythrina crista-galli*. **Phytochemistry**, n. 52, p. 373-382, 1999.
- MALLAVADHANI, U. V.; MAHAPATRA, A.; JAMIL, K.; REDDY, P. S. Antimicrobial activity of some pentacyclic triterpenes and their synthesized 3-o-lipophilic chains. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 10, p. 1576-1579, 2004.
- MARCHESELLI, V. L.; BAZAN, N. N. G. Sustained induction of prostaglandin endoperoxide synthase-2 by seizures in hippocampus-Inhibition by a platelet-activating factor antagonist. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, p. 24794-24799, 1996.
- MARQUES, J. O. Dor: diagnóstico e tratamento. **Bases da Anatomia e Fisiopatologia**. Âmbito Editora, v. 1, SP, 2004.
- MARTINS, C. M. Estudo químico, atividade antioxidante e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera caribaea* Mart. & Lucc (Pau-Santo) do cerrado. **Dissertação de Mestrado**, Uberlândia, 2012.
- MEDEIROS, R. M. T.; NETO, S. A. G.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; SOUSA, N. L. Mortalidade embrionária e abortos em caprinos causados por *Aspidosperma pyriforme*. **Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira** v. 24, p. 42-43, 2004.
- MEDEIROS, V. F.; XIMENES, M. F. F. M. Potencial larvicida de plantas da caatinga no controle de *Aedes aegypti*. *Journal of Ethnopharmacology*. In: MEDEIROS, V. F. Potencial larvicida de extratos de plantas regionais no controle de larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Dissertação (Mestrado)** – Centro de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2007.
- MELO-BATISTA, A. A.; OLIVEIRA, C. R. M. Plantas utilizadas como medicinais em uma comunidade do semi-árido baiano: saberes tradicionais e a conservação ambiental. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 74, Goiânia, 2014.
- MESSIADES, D. M. S. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyriforme* Mart. **Dissertação de Mestrado**, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, 2014.
- MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31-34, 1982.

MILLAN, M.J. The induction of pain: a integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164, 1999.

MITAINE- OFFER, A.C.; SAUVAIN, M.; VALENTIN, A.; CALLAPA, J.; MALLIE, M.; ZECHES-HANROT, M.. Antiplasmodial activity of *Aspidosperma* indole alkaloids. **Phytomedicine**, v.9, n. 2, p.142-145, 2002.

MITAINE, A. C.; MESBAH, K.; RICHARD, B.; PETERMANN, C.; ARRAZOL, S.; MORETTI, C.; HANROT, M. Z.; OLIVER, L. L. M.; **Planta Medica**. v. 62, p.458, 1996.

MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. Inflamações: conceitos gerais e inflamação aguda. **Patologia: Processos gerais**, Atheneu, 2 ed., p. 109-128, SP, 1999.

MUSTICH, G.; ZENK, P. Approfondimenti di alkaloid. The spectrum of biological activities of indole alkaloids. Indole and Biogenetically related alkaloids. **New York Toronto Sydney San Francisco: Academic Press-London**, p.1-10, 1980.

SCHALLEY, C. A. **International Journal of Mass Spectrometry**, v. 11, p.194, 2000.

MORAZZONI, P.; MALANDRINO, S. Anthrocyanins and their aglycons as scavengers offree radicals and antilipoperoxidant agents. **Pharmacological Research Communications**, v.20, p.254, 1988.

MORROW, J. P.; ROBERTS II, L. J. Autacoides e fator de ativação de plaquetas. In Goodman e Gilman. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11 ed, cap. 26, p. 503-516, Mac Graw Hill, RJ, 2007.

NEWMAN, J.; GORDAM, M. C.; KENNETH, M. S. The influence of natural products upon drug discovery. **Journal Natural Product Reports**, n. 17, p. 215-234, 2000.

NICHOLAS, A.; BAIJNATH, A.; **Revista Botanical**, v. 60, p. 440, 1994.

NIERO, R.; MALHEIROS, A. Principais aspectos químicos e biológicos de terpenos. In: CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. **Química de produtos naturais: novos fármacos e a moderna farmacognosia**, Editora Universidade do vale do Itajaí/Univali, p. 239-257, 2007..

NÓBREGA M. G. L. A. Perfil fitoquímico e farmacológico da *Aspidosperma pyriforme* Mart. “Ensaio pré-clínicos”. **Dissertação de Mestrado**: Universidade Federal de Pernambuco; Recife , 2008.

NOGUEIRA, P. C. N.; ARAÚJO, R. M.; VIANA, G. S. B.; ARAÚJO, D. P.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Plumeran Alkaloids and Glycosides from the Seeds of *Aspidosperma pyriforme* Mart. **Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 11, p. 2108-2120, 2014.

NUNES, D. S.; KOIKE, L.; TAVEIRA, J. J.; REIS, F. A. M. Indole alkaloids from *Aspidosperma pruinosum* **Phytochemistry**, v. 31, p. 2507, 1992.

OLINDA, A. C. C. Estudo da atividade antinociceptiva de um novo fator extraído do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. **Dissertação de Mestrado**. UFC, 2010.

OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphilum* (Alb) March. E de seus principais constituintes, misturas de alfa e beta amirina. **Tese de Doutorado** da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará, 2005.

OLIVEIRA, R. B., GODOY, S. A. P., COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**, Editora Holos, p. 64., Ribeirão Preto – SP, 2003.

OLIVEIRA, V. B. ALCALÓIDES INDÓLICOS DE *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE). **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro. Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2008.

OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical anti-inflammatory effects of the other extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **European Journal of Pharmacology**, v. 507, n. 1-3, p. 253-259, 2005b.

PELZER, L. E.; GUARDIA, T.; JUAREZ, O. A.; GUERREIO, E. Acute and chronic anti-inflammatory effects of plant flavonoids. **IL Farmaco**, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEREIRA, M. M.; JÁCOME, R. L. R. P.; ALVES, A. F. C. A.; RASLAN, D. S. Alcaloides indólicos isolados de espécies do gênero *Aspidosperma* (APOCINACEAE). **Química Nova**, vol. 30, N. 4, p. 970-983, 2007.

PERES, L. E. P. Metabolismo Secundário. Piracicaba. **Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz: ESALQ**, Universidade de São Paulo, p. 1-10, 2004.

PERES, L.E.P. Metabolismo secundário. <http://www.daneprairie.com> em 15/08/2005.

PHILLIPS, M. A.; LEÓN, P.; BORONAT, A.; RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 619-23, 2008.

PICADA, J. N.; SILVA, K. V. C. L.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, A. T.; HENRIQUES, J. A. P.. Genotoxic effects of structurally related beta-carboline alkaloids. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, n. 379, p. 135, 1997.

PIRES, A.F. Atividade antinociceptiva de uma lectina de sementes de *Canavalia brasiliensis* MART. **Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas)** - Universidade Estadual do Ceará - UECE, 2007.

PRESGRAVE, O. A. F. **Alternativas para animais de Laboratório: do animal ao computador**. Editora Fiocruz, RJ, 2002.

- RAMADABRAN, K.; BANSINATHI, M. A. Critical analysis of the experimental evaluation of nociceptive reactions in animals. **Pharmacology Research**, v. 3, p. 263-269, 1996.
- RANG, H. P.; DALE, M.M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6 ed, Guanabara Koogan, RJ, 2007.
- RAPINI, A.; Estudos em Asclepiadoideae (Apocynaceae) da cadeia do Espinhaço de Minas Gerais. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Brasil, 2000.
- RAVEN, P. H., EVERT, R. F., EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal.**, 6. ed., p. 906, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.
- REIS, F.A.M. *et al.* Indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v. 41, n. 3, p. 963-967, 1996.
- RIBEIRO, J. E. L. S.; HOPPKINS, M. J. G.; VICENTINI, A.; SOTHER, C. A.; COSTA, M. A. S.; BRITO, J. M.; SOUZA, M. A. D.; MARTINS, L. H. P.; LOHMANN, L. G.; ASSUNÇÃO, P. A. C. L.; PEREIRA, E. C.; SILVA, C. F.; MESQUITA, M. R.; PROCÓPIO, L. C.; **Flora da Reserva Ducke: Guia de Identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**, NPA: Manaus, 1999.
- RIET-CORREA, F.; BEZERRA, C. W. C.; MEDEIROS, R. M. T. Plantas tóxicas do Nordeste. **Sociedade Vicente Pallotti Editora**, Universidade Federal de Campina Grande., 2011.
- RIVAS, P.; CASSELS, B. K.; MORELLO, A.; REPETTO, Y.; **Comparative Biochemistry and Physiology - Molecular & Integrative Physiology, Part C**, v. 27, p. 122, 1999.
- ROBERT, G. M. T.; AHOND, A.; POUPAT, C.; POTIER, P.; JOUSSELIN, A.; JACQUEMIN, H.; **Journal Natural Products**, v. 46, p. 694, 1983.
- ROCHA, A. I.; REIS-LUZ, A. I.; RODRIGUES, W. A.; **Revista Acta Amazônica.**, v. 12, p. 381, 1982.
- ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. Uso terapêutico da flora na história mundial. **Revista HoloS**, v. 1, p. 49-61, 2015.
- RODRIGUES, J. V. M. Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Dissertação de Mestrado**, Campina Grande-PB, 2015.
- ROSS, J. A., KASUM, C. M. Dietary flavonoids: Bioavailability, Metabolic effects, and Safety. **Annual Review Nutrition**, v.22, p.19-34, 2002.
- RUOFF, G.; LEMA, M. Strategies in pain management: new and potential indications for COX-2 specific inhibitors. **Journal of pain and sympatom management**, v. 25, p. 21-30, 2003.

SAAD, G. A.; OLIVEIRA, L. P. H.; SÁ, I. M. de; SEIXLACK, A. C. C. Livro - **Fitoterapia Contemporânea - Tradição e Ciência na Prática Clínica**. 1ª Ed. Ed Elsevier, p. 364-369, 2009.

SALEEM, M. M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Lupeol modulates NF-kappaB and P13K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**, v. 23, p. 5203-5214, 2004.

SANTOS, P. B. Atividade biológica das folhas do Pereiro (*Aspidosperma pyriforme* Mart.) e do Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *cebil* (Gris.) Alts.) sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido**, UFCG, p. 45, Patos, PB, 2010.

SILVA, C. M. A. Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco- Uma inovação no controle de fitopatógenos. **Dissertação de Mestrado**, UFPE, Recife, 2013.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F.; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVA, J. C. Prostaglandinas: alguns aspectos de sua participação no processo inflamatório. **Revista Científica em Ciências da Saúde**, v. 8, n. 4, p. 37-38, 1986.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; CONCEIÇÃO G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

SILVA, R. C.; FERNANDES, P. R. D. ; MORAES, A. R.; BIZERRA, A. M. C. TESTES FITOQUÍMICOS EM EXTRATOS ORGÂNICOS DE *Aspidosperma pyriforme* (PEREIRO). **IX CONGIC**, 2011.

SILVELLO, C. L.C. O uso de plantas medicinais e de fitoterápicos no SUS: uma revisão bibliográfica. **[Monografia]**, p. 8-12, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed, UFSC, Porto Alegre, 2001.

SIQUEIRA, J. F. JR.; DANTAS, C. J. S. Mecanismos celulares e moleculares de Inflamação. **MeDSi**, p. 238, RJ, 2000.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características Farmacológicas Gerais das Plantas Medicinais. **Infarma**, v.16, n. 13-14, 2005.

SNIJDELAAR, D. G.; DIRKSEN, R.; SLAPPENDEL, R. Substance P. **European Journal of Pain**, v. 4, 121-135, 2000.

- SOSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; BIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBANO, A. Screening, of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 211-215, 2002.
- SOTTOMAYOR, M.; CARDOSO, I. L.; PEREIRA, L.G. Peroxidases and the biosynthesis of terpenoid indole alkaloids in the medicinal plant *Catharanthus roseus* (L.) G. Don. **Phytochemistry Reviews**, n 3, p. 159-171, Barceló, 2004.
- SREEVIDYA, N.; MEHROTRA, S. Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff's in Plant Materials. **Jornal of AOAC International**, v. 86, n.6, 2003.
- STRUWE, L.; ALBERT, V. A.; BREMER, B. Cladistics and family level classification of the Gentinales. **Cladistics**, v. 10, p. 175, 1994.
- SZAKIEL, A.; WASIUKIEWICZ, I.; JANISZOWSKA, W. Metabolism of [3-3H]oleanolic acid in the isolated *Calendula officinalis* leaf cells and transport of the synthesized glycosides to the wall and the extracellular space. **Acta Biochimica Polonica**, v. 42, p. 25-29, 1995.
- TANAKA, J.C.A. *et al.* Antileishmanial activity of indole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytomedicine**, v.14, p.377-380, 2007.
- TEDGUI, M.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular Wall circulation. **Research**, v. 88, p. 877-887, 2001.
- TIGRE, C.B. Silvicultura para as matas xerófilas. **DNOCS**, p. 175, Fortaleza:, 1968.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M..A.M. Plantas Medicinais: cura segura?, **Revista Química Nova**, v. 28, n. 3, p.519-528, 2005.
- VELLOSO, A. L.; SAMPAIO, E. V. S. B.; PAREYN, F. G. C. Ecorregiões propostas para o bioma Caatinga. Recife: Associação Plantas do Nordeste, Instituto de Conservação Ambiental. **The Nature Conservancy**, Brasil, 2002.
- VEPOORT, R., PUIGROK, C.L.M., BERRHRIM, S.A. (1982) Medicinal plantas of Surinam: Antimicrobial active alkaloids from *Aspidosperma marcgravianum*. **Planta Medica**, n. 46, p. 149-152, 1982.
- VIANA, F. F. O. Bioatividade dos extratos obtidos da parte aérea de *Aspidosperma pyrifolium* (Apocynaceae) sobre larvas de *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **Dissertação de Mestrado**, Itapetinga, 2015.
- VITOR, A.O.; PONTE, E.L.; SOARES, P.M.; LIMA, R.C.S.; VASCONCELOS, S.M.M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **RECIIS**, v.2, n.1, p.87-96, 2008.
- VODOVOTZ, Y; CSETE, M.; BARTELS, J.; CHANG, S.; AN, G. Translational Systems Biology of Inflammation. Plos computational Biology. **Doi 10.1371/ Journal pclei.1000014**. Advance online publication, 2008.

WALKER, T. D. The medicines trade in the Portuguese Atlantic World: acquisition and dissemination of healing knowledge from Brazil (c. 1580-1800). In: **Social History of Medicine Advanced Access**. Oxford: Oxford University Press, 2013.

WHITE, M. Mediator of inflammation and the inflammation process. **Journal Allergy Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, p. 378-381, 1999.

WOOLF, C.J. A new strategy for the treatment of inflammatory pain prevention or elimination of central sensitization. **Drugs**, v. 47, p. 1-9, 1994.

XAVIER, J. F.; SILVA, J.; SANTOS, R.R.; ALBUQUERQUE, R. S.; AZEVEDO, C. A. V.; FERREIRA, A. C. Plantas medicinais cultivadas e utilizadas pelos agricultores das microrregiões Paraibanas: Curimataú e Seridó. **Cadernos de Agroecologia**, v. 6, n. 2, 2011.

XIE, W. L.; CHIPMAN, J. G.; ROBERTSON, D. L. Expression of amitogen-responsive gene encoding prostaglandin synthase is regulated by mRNA splicing. **Proceedings national Academy Science**, v. 88, p. 2692-2696, USA, 1991.

YOSHKAI, Y. Roles of prostaglandins and leukotrienes in acute inflammation caused by bacterial infection. **Current opinion infections Diseases**, v. 14, p. 257-263, 2001.

YUNES, R. A. **Plantas medicinais sob a ótica da moderna química medicinal**. Ed. Argos, Chapeco, 2001.

ZENK, P. The spectrum of biological activities of indole alkaloids. Indole and Biogenetically related alkaloids. **New York-Toronto-Sydney-San Francisco: Academic Press-London**, p.1-10, 1980.

CAPÍTULO 1

LINS, F. S. V. **CONSTITUINTES QUÍMICOS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** Campina Grande, PB: UEPB, 2016. (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

1. INTRODUÇÃO

A identificação de metabólitos secundários provenientes de espécies vegetais vem sendo objetivo de muitos estudos, incentivando pesquisas na área de fitoquímica de plantas medicinais, colaborando assim para o conhecimento da constituição química, bem como sua relação com as ações biológicas que provocam no organismo. Com base nisso, esses produtos vêm sendo utilizados atualmente como alimentos ou fármacos, confirmando o conhecimento empírico estabelecido pelas comunidades (SANTOS, 2010).

Aspidosperma pyrifolium Mart. (Pereiro), é uma planta da família Apocynaceae, geralmente encontrada na caatinga nordestina e é bastante utilizada na medicina tradicional contra afecções do trato respiratório, digestório e urinário, assim como no controle da febre, vômitos e dermatites. Na medicina veterinária é usada no tratamento de ectoparasitoses de animais domésticos (SANTOS, 2010; MESSIADES, 2014; RODRIGUES, 2015).

Vários estudos já comprovaram a existência de algumas classes de metabólitos secundários existentes em extratos provenientes dessa espécie, como alcaloides, flavonoides (ex.: rutina), triterpenos, esteroides, iridoides, saponinas, taninos, bem como açúcares redutores e glicosídeos. Segundo a literatura, propriedades biológicas já foram comprovadas, a exemplo de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, estando essas associadas principalmente a seus alcaloides indólicos (NÓBREGA, 2008; SILVA et. al., 2011, MESSIADES, 2014).

Estudo da fração aquosa do extrato etanólico de sementes de *A. pyrifolium* mostrou que a espécie é uma fonte promissora de alcaloides indólicos plumerânicos. Entre os compostos obtidos, o alcaloide (3 α H) - 15 (14 \rightarrow 3) -abeo-aspidofractinina foi isolado pela primeira vez, assim como os compostos N-metilakuammidina, ácido logânico, loganina e ácido 2-hidroxi-3-O-b-D-glucopyranosylbenzoico. Além disso, o alcaloide N-acetilaspido-fractinina foi pela primeira vez obtido como um produto natural e suas atribuições de dados de RMN de ^1H e ^{13}C estão sendo relatados também pela primeira vez (NOGUEIRA et al., 2014).

O presente estudo teve como objetivo realizar uma caracterização fitoquímica da fase hexânica e da fração de alcaloides totais de *A. pyriforme* Mart., tendo como enfoque a identificação dos compostos isolados a partir de técnicas cromatográficas e espectroscópicas.

2. MATERIAIS E MÉTODOS:

2.1. Local da pesquisa:

A maior parte da pesquisa fitoquímica (desde a secagem do material botânico, preparo e partição do extrato bruto, isolamento da fase alcaloídica, cromatografia em coluna e cromatografia em camada delgada) foi realizada no Laboratório de Fitoquímica da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB).

A técnica de cromatografia em coluna de média pressão (utilizada para isolar as frações da fase alcaloídica) foi realizada no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPerFarm), também na Universidade Federal da Paraíba.

A técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectroscopia de massas de baixa resolução foi realizada no Laboratório de Pesquisas Químicas do Instituto Nacional do Semiárido (INSA), na cidade de Campina Grande-PB.

A espectroscopia no Infravermelho foi realizada no Centro de Biotecnologia (CBiotec), da Universidade Federal da Paraíba, e os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram obtidos no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPerFarm), também na Universidade Federal da Paraíba.

2.2. Material botânico

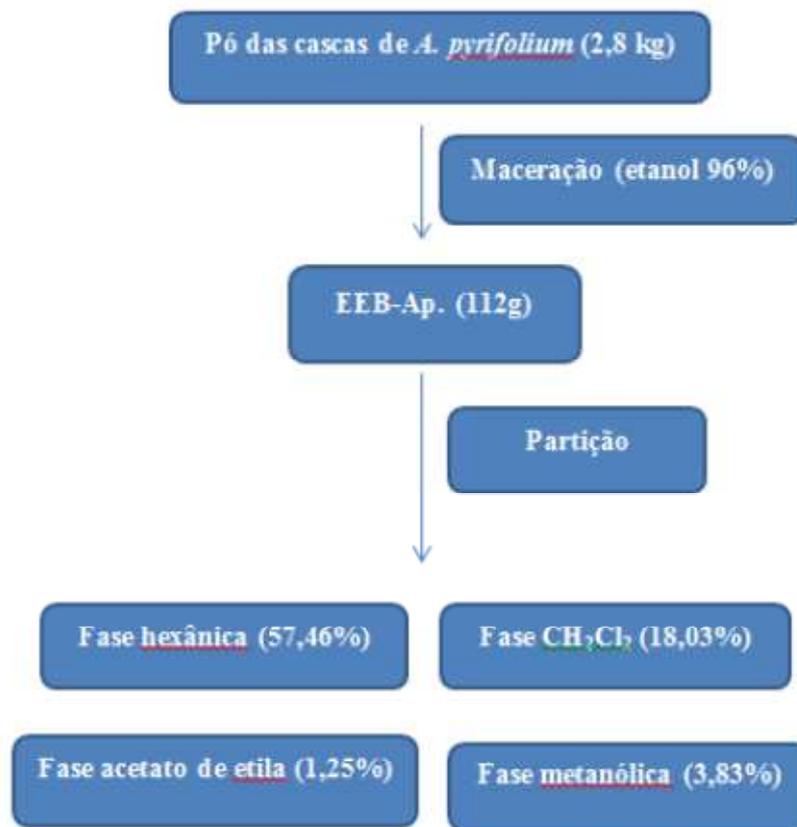
As cascas do caule de *A. pyriforme* Mart. foram coletadas no sítio Capim Grande, nas proximidades do distrito de São José da Mata, Campina Grande, Paraíba, no mês de agosto de 2014 (coordenadas: S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). Após a coleta, o material foi identificado por comparação através de estudos já realizados na Universidade Estadual da Paraíba, no qual a amostra coletada foi identificada pelo Prof. Dr. Leonardo Pessoa Félix e a exsiccata depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes na Universidade Federal da Paraíba, sob o número 20104 (MESSIADES, 2014).

2.3. Preparação do extrato etanólico bruto

As cascas de *A. pyriformium* Mart. foram secas em estufa de circulação de ar (40 °C) e pulverizadas em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Posteriormente, foram submetidas à extração por técnica de maceração a temperatura ambiente, usando etanol a 96% como solvente (planta:solvente, 1:5 m/V). A cada 3 dias o macerado era filtrado e guardado em recipiente fechado e o restante do material usado para nova extração, renovando-se o solvente. Esse processo foi feito durante 4 semanas até total saturação do material vegetal. O extrato obtido foi evaporado em evaporador rotativo (TE – 21 da TECNAL), acoplado à uma bomba de vácuo (TE – 0581 da TECNAL), obtendo-se ao final 552 g do extrato etanólico bruto de *A. pyriformium* (EEB-Ap) (MESSIADES, 2014).

2.4. Partição do EEB-Ap:

Uma parte do EEB-Ap (112g) foi submetida a uma partição em ampola de separação, utilizando solventes de polaridade crescente, obtendo-se ao final da partição as seguintes fases com seus respectivos rendimentos: fase hexânica (57,46% /Peso=64,36g), fase clorofórmica (18,03% / Peso=20,2g), fase acetato de etila (1,25% / Peso=1,4g) e, por fim, a fase metanólica (3,83% / Peso=4,28g). A fase hexânica (de maior rendimento) foi submetida à cromatografia em coluna. Abaixo segue o fluxograma 2, mostrando desde o processo de extração até a obtenção das fases.



Fluxograma 2: Processamento das cascas do caule até obtenção das fases de *A. piryfolium* Mart.

2.5. Cromatografia em Coluna (CC) da fase hexânica:

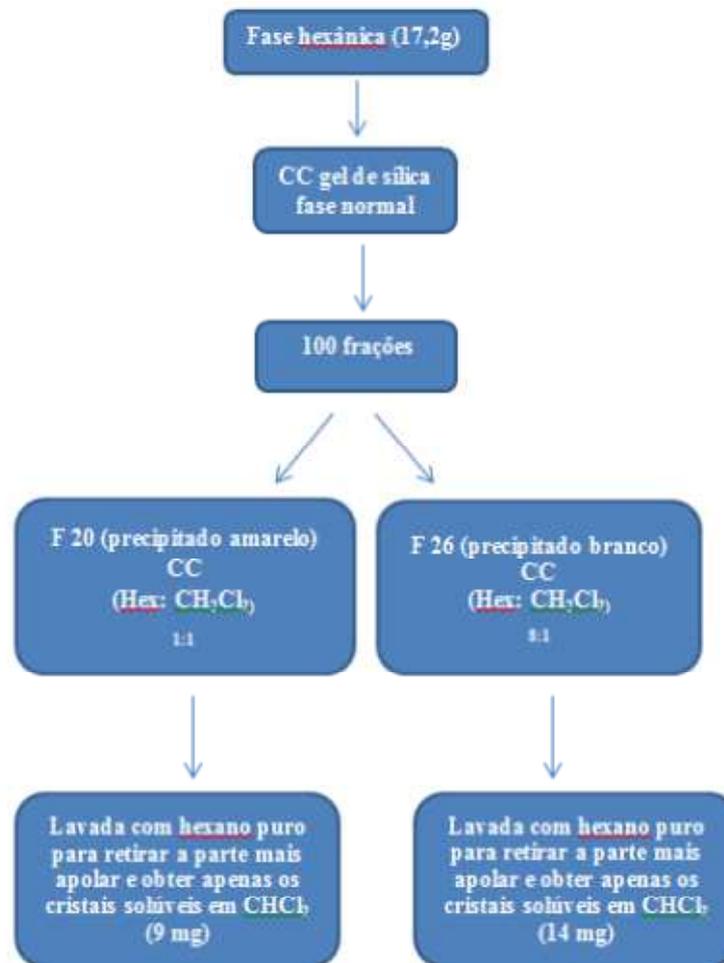
Para análise cromatográfica em coluna da fase hexânica (17,01 g) foi utilizada sílica-gel como fase estacionária e como fase móvel solventes de polaridade crescente, desde hexano até metanol 100%. Dessa coluna foram obtidas 100 frações.

As frações 1-41 mostraram caráter apolar, onde as eluições foram realizadas até diclorometano 100%.

A fração 20 (precipitado amarelo – 9 mg), foi retirada da coluna utilizando sistema de solventes Hex:CH₂Cl₂ (1:1 V:V). Após secagem, a fração foi diluída várias vezes em hexano puro, para separar a parte mais oleosa. A parte solúvel apenas em diclorometano 100% (cristais amarelos) foi a escolhida para análise de cromatografia em camada delgada.

A fração 26 (precipitado branco – 14 mg) foi retirada da coluna em sistema Hex : CH₂Cl₂ (8:2). Após secagem, a fração foi diluída várias vezes em hexano puro, para separar

a parte mais oleosa. A parte solúvel apenas em diclorometano 100% (cristais brancos) foi a escolhida para análise de cromatografia em camada delgada (fluxograma 3).



Fluxograma 3: Cromatografia em coluna das frações 20 e 26 da fase hexânica até chegar no composto puro.

2.6. Obtenção da fração de alcaloides totais de *A. pyrifolium* Mart (FAT-Ap):

400 g do EEB-Ap foi submetido a uma marcha sistemática para obtenção de alcaloides a partir das seguintes etapas:

- 300 mL de ácido clorídrico a 3% foram adicionados ao EEB-Ap até atingir pH 3,0-4,0;
- Em seguida, a solução foi aquecida em banho-maria por 10 min;
- Após esfriar, a suspensão foi filtrada;

- O filtrado foi alcalinizado com solução de hidróxido de amônio a 10% até pH 10 e, posteriormente extraído com clorofórmio até reação negativa com reagente de Dragendorff;
- A fase aquosa basificada foi descartada e a clorofórmica lavada com água, desidratada com Na_2SO_4 anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida a 55°C em evaporador rotativo, obtendo-se a fração de alcaloides totais de *A. pyrifolium* (FAT-Ap), com rendimento de 2,29% (DI ASSIS, et. al., 2009) (fluxograma 4).



Fluxograma 4: Obtenção da FAT-Ap.

Após secagem, 1 mg da FAT-Ap foi pesado e colocado em tubo de ensaio para teste qualitativo com reagente de Dragendorff, formando um precipitado vermelho intenso,

indicando a presença de alcaloides (Figura 21). Uma parte da FAT-Ap. foi utilizada para análise de cromatografia em coluna.

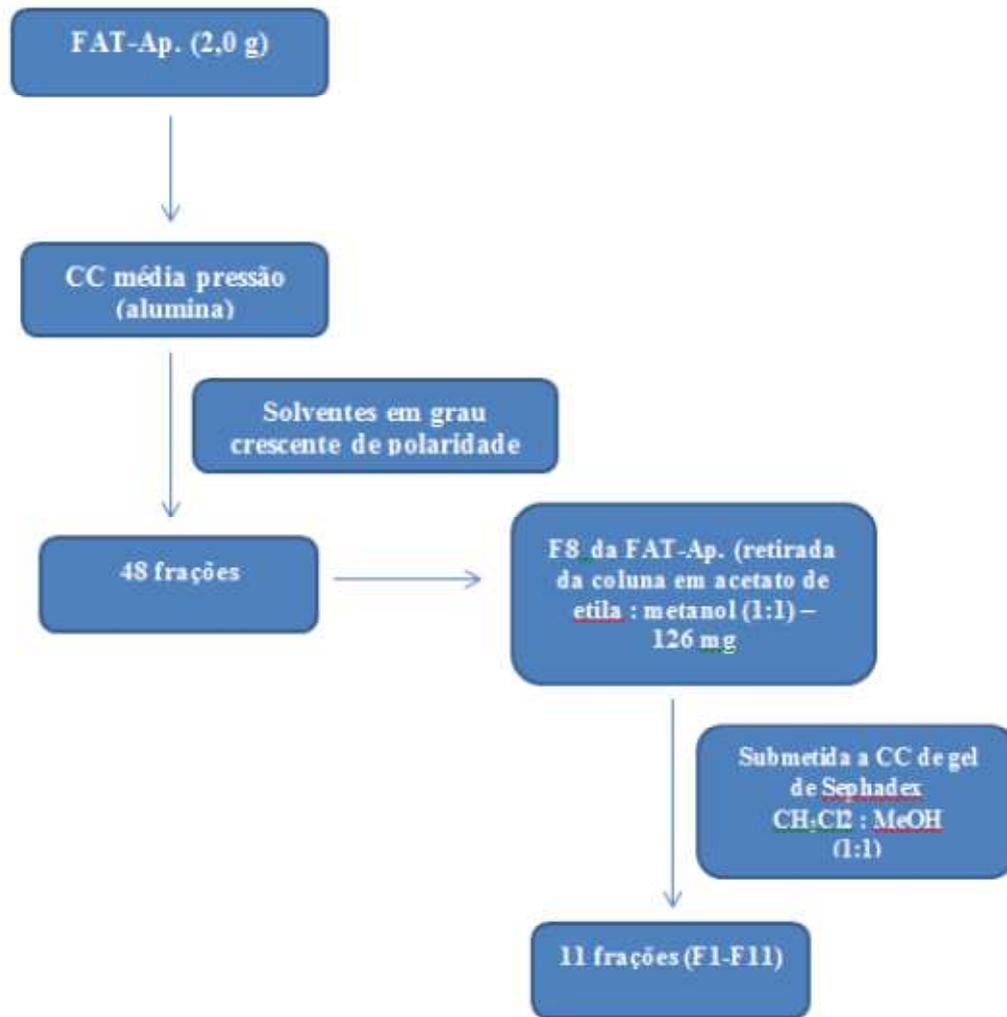


Figura 21: Reação positiva para presença alcaloides (Fonte: dados da pesquisa).

2.7. Cromatografia em Coluna (CC) da FAT-Ap:

A análise cromatográfica em coluna da FAT-Ap. (2g) foi realizada em cromatógrafo de média pressão, tendo alumina como fase estacionária e como fase móvel solventes de polaridade crescente, desde hexano até metanol 100%. A maioria das frações (14-48) foram eluídas com solventes mais polares, desde acetato de etila 100% até metanol 100%. Foram obtidas ao final 48 frações.

Dessas 48 frações, a fração 8 (F8 - FAT-Ap.- 126 mg), a qual foi retirada da coluna com sistema de solventes acetato de etila:metanol (1:1 - V:V), foi submetida a cromatografia por exclusão em coluna de Sephadex, utilizando como fase móvel clorofórmio:metanol (1:1 V/V), obtendo-se nesta etapa 11 frações (fluxograma 5).



Fluxograma 5: Cromatografia em coluna de média pressão da FAT-Ap.

2.8. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

A mistura das frações 9 a 11 (F9-11FAT-Ap) (86mg), provenientes da coluna de Sephadex, realizada com a F8 (retirada da coluna de média pressão), foi submetida à cromatografia líquida de alta eficiência em dois cromatógrafos diferentes. O perfil cromatográfico da amostra foi analisado em CLAE analítico e os picos detectados foram separados e coletados em CLAE preparativo.

Para análise em CLAE analítico foi utilizado o sistema Infinity Series More Confident 1260 (600 bar) da marca Agilent,

Antes da injeção a fração foi diluída em solução aquosa a 0,2% de ácido trifluoroacético (TFA):acetonitrila (ACN) (1:1 - V:V) na concentração de 1 mg/mL e, posteriormente, filtrada e o volume injetado no aparelho foi de 50 µL. Foi utilizada coluna

C-18 de fase reversa, mantida a 40 °C e como fase móvel solução aquosa a 0,2% de TFA:ACN (77:23 à 65:35 – V:V), com fluxo de 10 mL/min, tempo de 15 minutos, modo gradiente.

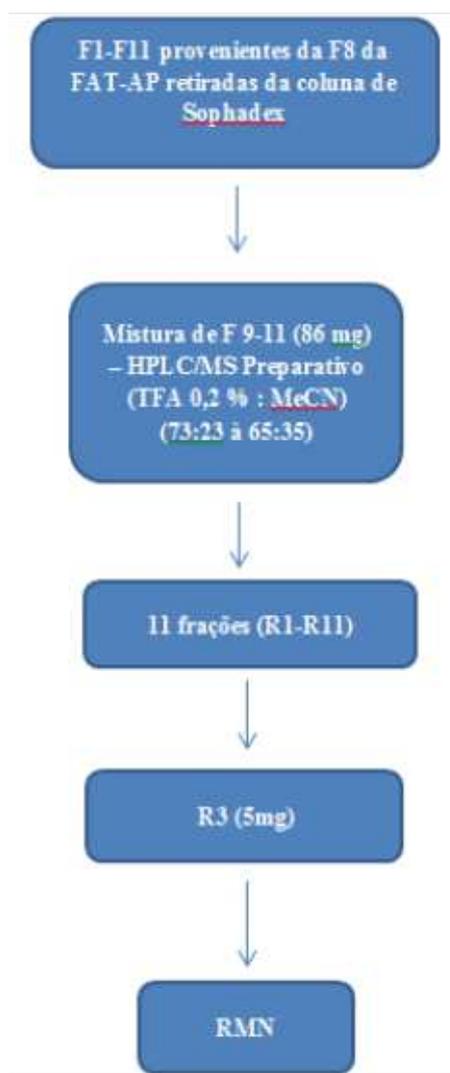
Para isolamento e coleta dos picos detectados em CLAE analítico, foi utilizados Sistema 2767 Sample Manager da marca Waters, software MassLinx™, com detector UV-Vis de foto diodo (CLAE-DAD), acoplado a espectrômetro de massas de baixa resolução e inserção direta, com fonte de eletrospray e analisador quadrupolar de armadilha de íons (ions trap) com modo ESI+. Antes da injeção a fração foi diluída em solução aquosa a 0,2% de TFA:ACN (1:1 - V:V) na concentração de 1 mg/mL e, posteriormente, filtrada e o volume injetado no aparelho foi de 200 µL. Foi utilizada coluna C-18 de fase reversa, mantida a 40 °C e como fase móvel solução aquosa a 0,2% de TFA:ACN (77:23 à 65:35), com fluxo de 10 mL/min, tempo de 15 minutos, modo gradiente. Ao final foram obtidas 10 frações (R1-R10). As fração R3 foi as que apresentou maior rendimento e seu cromatograma corresponde aos picos de maior intensidade na amostra (fluxograma 6).

O sistema de eluição utilizado para coleta das frações por CLAE-EM está descrito na tabela 2:

Tabela 1: Sistema gradiente utilizado para separação dos picos da F9-11 da FAT-Ap em CLAE preparativo.

Tempo (minutos)	Solvente A (%)	Solvente B (%)
0	77	23
2,1	75	25
4	74	26
5,3	73	27
7,9	71	29
9,8	70	30
12,0	68	32
13,6	66	34
15	65	35

Solvente A: solução aquosa 0,2% TFA / Solvente B: acetonitrila 100%



Fluxograma 6: Obtenção da fração R3 por CLAE-preparativo.

2.9. Análise espectroscópica no infravermelho (IV):

Para análise no infravermelho, 1 mg da fração F26, proveniente da fase hexânica foi purificada e submetidas à análise espectroscópica no infravermelho médio, utilizando pastilhas de KBr, com objetivo de verificar quais os possíveis grupos funcionais estariam presentes nas moléculas. Os dados espectrais foram registrados em aparelho BOMEN FT-IR (modelo MB-100).

2.10. Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN):

As frações 20 e 26 da fase hexânica, bem como a fração R3 da Fat-Ap (separada por CLAE) foram submetidas à técnica de RMN, para obtenção dos espectros de RMN de ^1H e

^{13}C , utilizando técnicas uni e bidimensionais. Os espectros foram registrados em espectrômetro VARIAN SYSTEM, operando a 500 MHz (RMN ^1H) e 125 MHz (RMN ^{13}C).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Dados Cromatográficos:

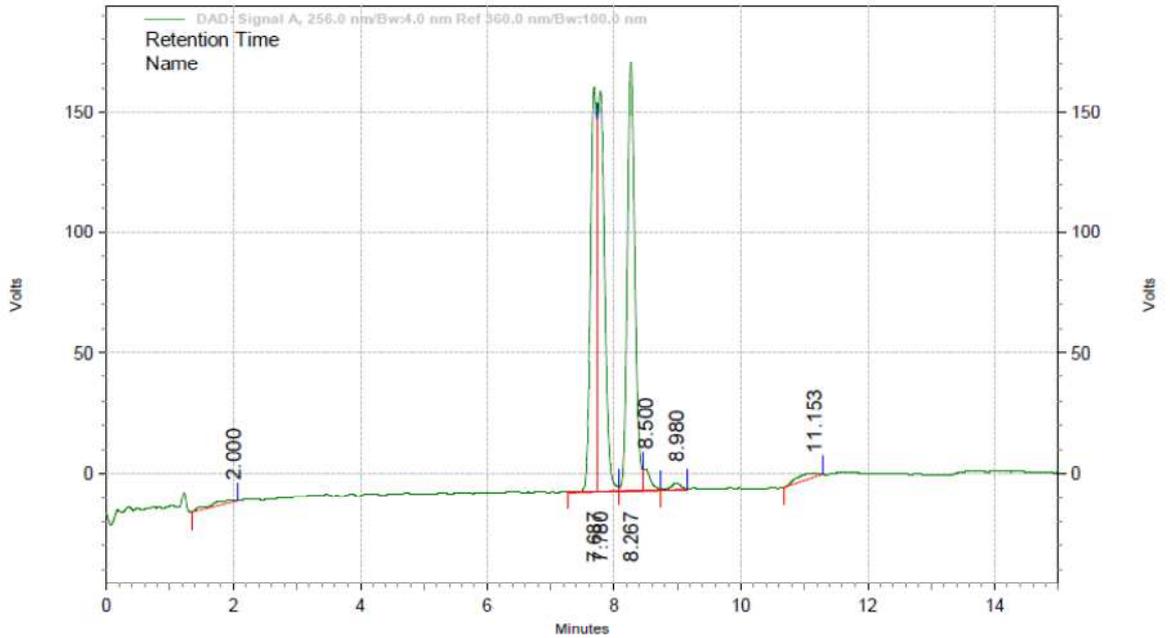
3.1.1. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE):

A fração F9-11 foi injetada 10 vezes no sistema CLAE analítico até que fossem ajustadas as condições adequadas para separação em CLAE preparativa. O perfil da amostra pode ser visualizado na figura 37, onde os picos são mostrados de acordo com o tempo de retenção (TR) de cada constituinte, em uma eluição de 15 minutos.

Durante toda a análise a amostra apresentou cinco picos principais, onde os tempos de retenção (TR) concentravam-se entre 7,6 e 9,7. Os TRs muito próximo dos constituintes dificultaram a separação dos picos e nenhuma das frações obtidas apresentou perfil com 100% de pureza.

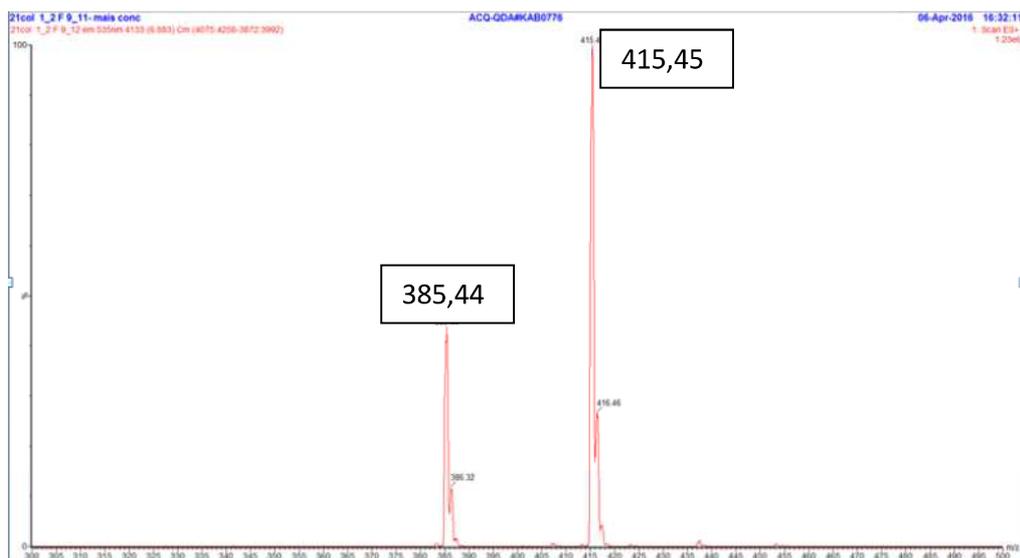
Ao final, foram feitas 12 injeções da amostra e coletadas 10 frações (R3-R10), das quais apenas uma (R3) foi possível de ser detectada por RMN, devido ao baixo rendimento obtido no final da análise. A fração R3 correspondia aos picos de maior intensidade e seu perfil após o isolamento pode ser visualizado no cromatograma da figura 22.

Figura 22: Cromatograma de R3 obtido por CLAE preparativa (fase móvel solução aquosa a 0,2% de TFA:ACN (77:23 à 65:35 - V:V), com fluxo de 10 mL/min em um tempo de 15 minutos, modo gradiente.



O cromatograma com as massa de R3 estão presentes na figura 39. Os picos de R3 apresentaram massas 385,44 e 415,45 (figura 23).

Figura 23: Massas correspondentes aos picos de R3 (CLAE-MS-DAD-ESI+) em fase móvel [solução aquosa a 0,2% de TFA: ACN (77:23 à 65:35 - V:V)], com fluxo de 10 mL/min, tempo de 15 minutos, modo gradiente.



3.2. Dados Espectroscópicos:

- **Identificação dos compostos paristina e liquexantona (F20)**

A fração F20 apresentou-se como um sólido cristalino alaranjado. O espectro no IV (Figura 24, página 94) apresentou uma banda larga em torno de 3400 cm^{-1} , sugestiva de hidroxila quelada na molécula. Em 1720 cm^{-1} , foi vista uma banda intensa característica de carbonila de cetona, além de bandas em 1600 e 1200 cm^{-1} , sugestivas de ligações entre carbonos sp^2 e ligação C-O (PAVIA et al., 2010).

No espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) (figuras 25-33, páginas 94-98), foi possível visualizar três singletos em δ_{H} 13,38, 12,30 e 12,11, sugestivos de hidroxilas queladas. Além disso, observou-se sinais em δ_{H} 7,62 (d, $J=1,6$ Hz, 1H), δ_{H} 7,36 (d, $J=2,5$ Hz, 1H), δ_{H} 7,07 (d, $J=1,6$ Hz, 1H), δ_{H} 6,68 (s, 1H), δ_{H} 6,67 (d, $J=1,6$, 1H), δ_{H} 6,65 (d, $J=1,6$ Hz, 1H), δ_{H} 6,32 (d, $J=2,3$ Hz, 1H) e δ_{H} 6,29 (d, $J=2,3$ Hz, 1H), todos característicos de hidrogênios aromáticos, além dos sinais em δ_{H} 3,93 (s, 3 H), δ_{H} 3,89 (s, 3 H) e δ_{H} 3,87 (s, 3H), sugestivos de metoxilas ligadas a anel aromático. E em δ_{H} 2,84 (s, 3H) e δ_{H} 2,44 (s, 3H), atribuídos a metilas ligadas a carbonos sp^2 de anel aromático.

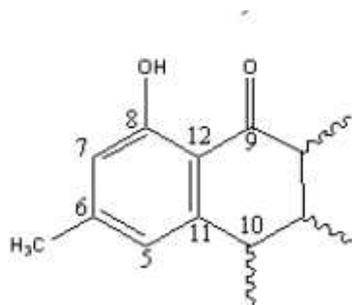
No espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, CDCl_3) (figura 34, página 99), técnica APT, foram vistos 32 sinais, sendo 19 para carbonos não hidrogenados (δ_{C} 190,9; 182,54; 182,15; 166,5; 165,3; 165,9; 163,9; 163,6; 162,3; 190,9; 159,55; 156,9; 148,5; 143,4; 135,5; 133,8; 113,1; 110,3 e 104,2), 8 para carbonos metilênicos (124,6; 121,4; 115,3; 108,3; 106,9, 98,4; 96,9 e 92,2) e 6 para carbonos metílicos (56,23, 55,85, 55,79, 23,91, 23,59 e 22,31), sugerindo que o composto em questão trata-se de uma mistura.

A presença das hidroxilas em ponte de hidrogênio com carbonos e das metilas em δ_{C} 22,3 e 23,9 são sugestivos de substituintes de núcleo antraquinônico e xantônico (MICHELETTI et al., 2009; PAES, 2012).

Na análise do espectro do mapa de contorno HSQC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) (figura 35, página 99), foram observadas as correlações entre δ_{H} 7,07/ δ_{C} 124,65, δ_{H} 7,62/ δ_{C} 121,43, δ_{H} 7,36/ δ_{C} 108,36 e δ_{H} 6,67/ δ_{C} 106,92, sugestivas de presença de 2 anéis tetrassubstituídos.

No primeiro anel foram vistas as correlações no mapa de contorno HMBC ($^1\text{H} \times ^{13}\text{C}$) (figura 36, página 100) de δ_{H} 7,07/ δ_{C} 113,1 e 22,31 e de δ_{H} 7,62/ δ_{C} 182,15, 124,65, 113,8 e 22,31, além das correlações no mesmo espectro entre δ_{H} 12,11/ δ_{C} 162,65, 113,8 e 124,5 e de δ_{H} 2,44/ δ_{C} 148,59, 124,65 e 121,43, confirmando os deslocamentos em δ_{C} 113,41, 162,65, 124,65, 148,59, 121,43, 113,82 e 182,15 para as posições: 12, 8, 7, 6, 5, 11 e 10,

respectivamente, com um substituinte hidroxílico na posição C-8, sugerindo que na posição C-9 exista uma carbonila e, em C-6, uma metila.



O sinal em δ_H 7,36 mostrou no HMBC (figura 36, página 100) correlação com δ_C 182,15 e 106,92 e o sinal em δ_H 6,69 com δ_C 165,34, 163,73, 110,38 e 108,36. Visualizou-se também no HMBC correlações entre δ_H 3,94/ δ_C 166,73, e de δ_H 12,31/ δ_C 165,34, que confirmam a presença da metoxila em δ_H 3,94 na posição C-3 e outra hidroxila em ligação de hidrogênio com a carbonila em δ_C 190,8, na posição 1.

Os sinais em δ_C 106,92; 165,34, 166, 73; 110,38; 108,36 e, por exclusão em 135,8, foram confirmados para os carbonos 2, 1, 3, 13, 4 e 14, respectivamente (Figura 37, tabela 2, página 92).

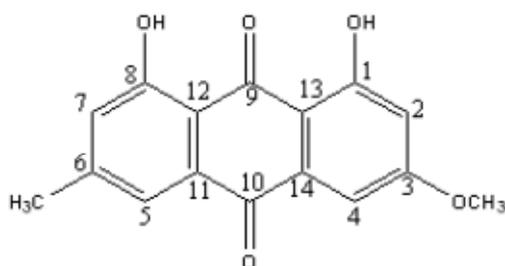


Figura 37: Fórmula estrutural do composto paristina

No mapa de correlação HSQC (figura 35, página 99) foram visualizados também as correlações de δ_H 6,65/ δ_C 115,3, δ_H 6,68/ δ_C 98,41, δ_H 3,89/ δ_C 55,84 e δ_H 2,87/ δ_C 23,9.

Já no HMBC foram visualizadas as correlações entre δ_H 6,65/ δ_C 98,41, 23,91, 113,1, 163,88 e δ_H 6,68/ δ_C 159,55, δ_H 3,89/ δ_C 163,88 e δ_H 2,85/ δ_C 143,64, 115,59 e 113,11, o que permitem atribuir os sinais em δ_C 115,3, 98,61, 113,11, 163,88, 159,55 e 143,64 para as posições: 7, 5, 8a, 6, 10a e 8, respectivamente, além da metila em δ_H 2,84 em C-8 e da metoxila em δ_H 3,89 em C-6.

Ainda no HSQC foram vistas as correlações δ_H 6,32/ δ_C 92,22, δ_H 6,29/ δ_C 96,31 e δ_H 3,87/ δ_C 55,89, e no HMBC entre δ_H 6,29/ δ_C 96,81 e 157,12, δ_H 6,32/ δ_C 163,90, 165,90,

165,96, 104,26 e 92,11, δ_H 13,38/ δ_C 163,90 e 96,91 e δ_H 3,87/ δ_C 165,36, o que confirmam os sinais em δ_C 96,31, 157,12, 163,90, 165,96, 104,24 e 92,22 para os carbonos 2, 4a, 1, 3, 9a e 4, respectivamente, assim como a metoxila (δ_H 3,86) em C-3, e a hidroxila (δ_H 13,38) em C-1 (Figura 38, tabela 3, página 93).

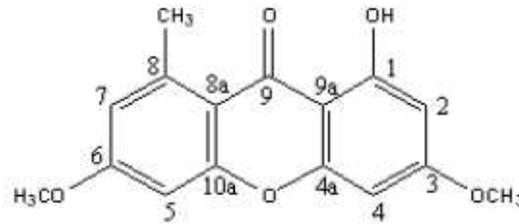


Figura 38: Fórmula estrutural do composto liquexantona

A análise dos dados espectroscópicos de IV e de RMN de 1H e ^{13}C , incluindo técnicas bidimensionais, além de dados da literatura (tabelas 2 e 3), permitem identificar a mistura de compostos como sendo: paristina (1,8-diidroxi-6-metil-3-metoxiantraquinona) e liquexantona (1 hidroxil-3,6-dimetoxi-8-metilxantona), isoladas anteriormente das espécies *Picramnia ramiflora* (PICRAMNIACEAE) e *Zanthoxylum petiolare* (RUTACEAE), respectivamente, mas obtidas pela primeira vez na família Apocinaceae.

Vale ressaltar, que as antraquinonas e xantonas geralmente se apresentam como substâncias cristalinas de cor amarela, vermelha ou laranja e estão distribuídas largamente no reino vegetal, desde plantas superiores até fungos e líquens (PAES, 2012).

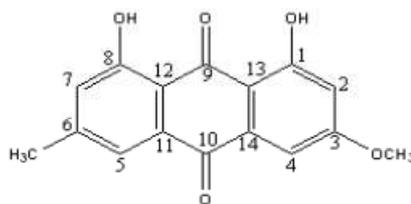


Tabela 2: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto paristina (F20) proveniente da fase hexânica em comparação com dados da literatura da mesma substância já isolada.

	δ_{C} de F20	δ_{H} de F20	δ_{C} paristina (PAES, 2012)	δ_{H} paristina (PAES, 2012)
C				
1	165,3	-	164,0	-
3	166,5	-	165,6	-
6	148,5	-	148,7	-
8	162,3	-	162,4	-
9	190,0	-	190,8	-
10	182,1	-	181,3	-
11	133,8	-	133,3	-
12	113,1	-	113,6	-
13	110,3	-	110,5	-
14	135,5	-	135,7	-
CH				
2	106,9	6,67 (d, $J=1,61$ Hz, 1H)	106,8	6,67 (d, $J=2,4$ Hz)
4	108,3	7,36 (d, $J=2,5$ Hz, 1H)	108,3	7,35 (d, $J=2,4$ Hz)
5	121,4	7,62 (d, $J=1,61$ Hz, 1H)	121,4	7,62 (sl)
7	124,6	7,07 (d, $J=1,61$ Hz, 1H)	124,6	7,07 (sl)
CH₃				
Me-6	22,3	2,44 (s, 3H)	22,1	2,44 (sl)
MeO-3	56,2	2,93 (s, 3H)	56,1	3,93 (s)
HO				
1	-	12,30 (s, 1H)	-	12,30 (s)
8	-	12,11 (s, 1H)	-	12,11 (s)

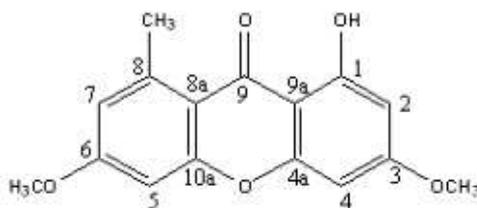


Tabela 3: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto liquexantona (F20) proveniente da fase hexânica em comparação com dados da literatura da mesma substância já isolada.

	δ_{C} de F20	δ_{H} de F20	δ_{C} liquexantona (MICHELETTI, 2009)	δ_{H} liquexantona (MICHELETTI, 2009)
C				
1	163,9	-	163,7	-
3	165,9	-	165,7	-
4a	156,9	-	156,9	-
6	163,6	-	163,7	-
8	143,4	-	143,4	-
8a	113,1	-	112,8	-
9	182,1	-	182,3	-
9a	104,2	-	104,1	-
13	159,5	-	159,3	-
CH				
2	96,31	6,29 (d, $J=2,61$ Hz, 1H)	96,7	6,26 (d, $J=2,6$ Hz, 1H)
4	92,22	6,32 (d, $J=2,3$ Hz, 1H)	92,0	6,28 (d, $J=2,6$ Hz, 1H)
5	98,4	6,68 (sl, 1H)	98,4	6,63 (d, $J=2,6$ Hz, 1H))
7	115,3	6,65 (dd, $J=2,51$ Hz, 1H)	115,4	6,62 (sl, 1H))
CH₃				
Me-8	23,4	2,44 (s, 3H)	22,1	2,44 (sl)
MeO-3	55,7	3,93 (s, 3H)	55,63	3,88 (s, 3H)
Me-6	55,8	3,87 (s, 3H)	55,69	3,86 (s, 3H)
HO				
1	-	13,38 (s, 1H)	-	13,37(s)

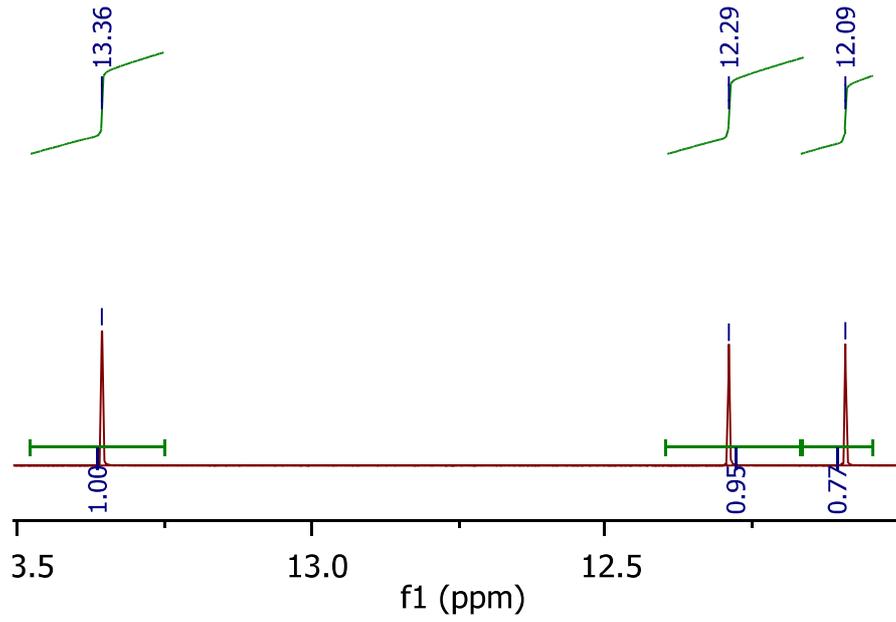


Figura 26: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

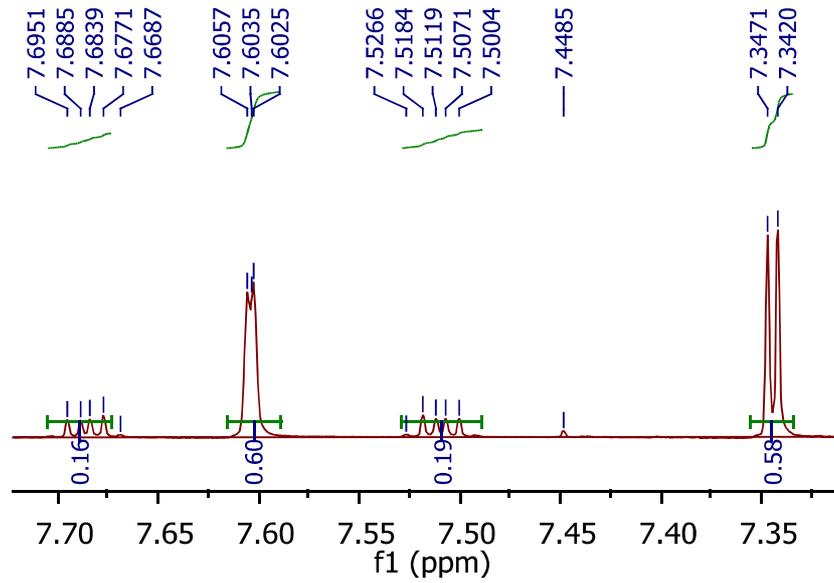


Figura 27: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

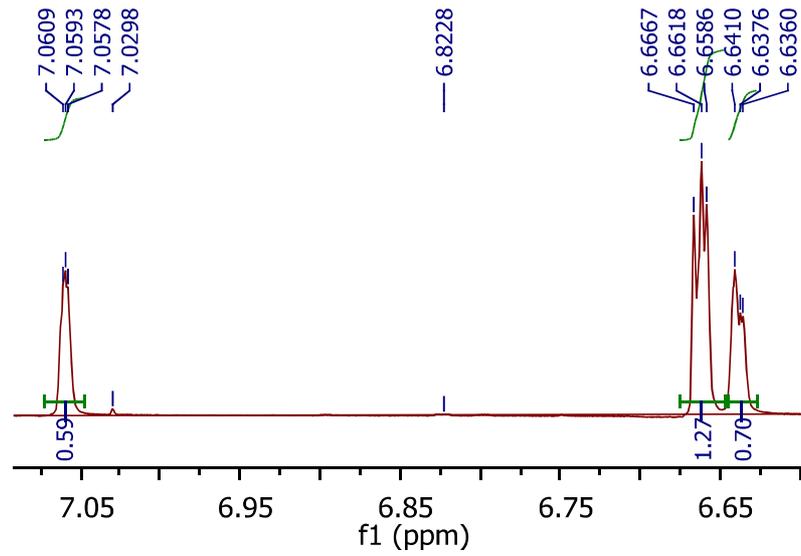


Figura 28: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

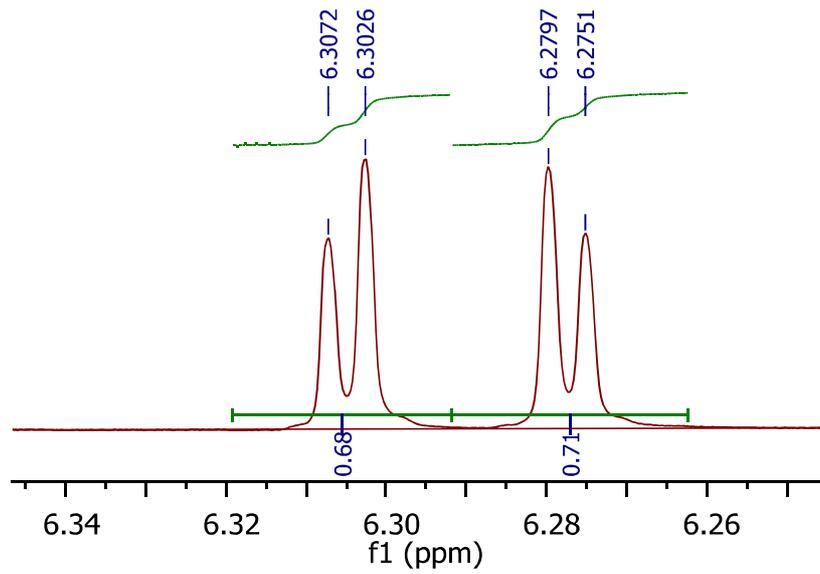


Figura 29: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

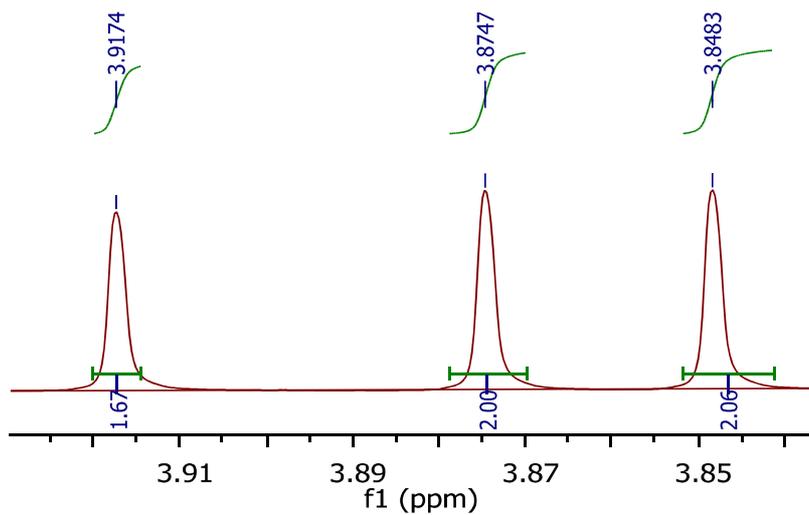


Figura 30: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

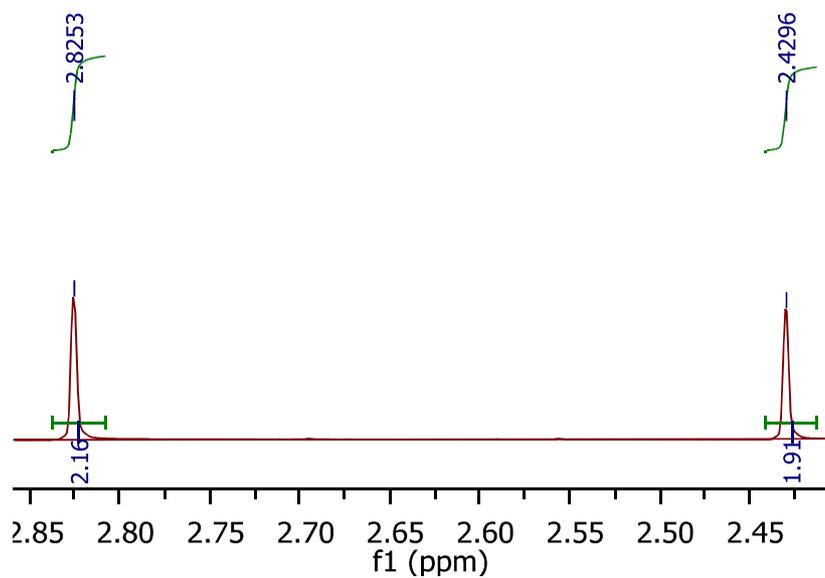


Figura 31: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

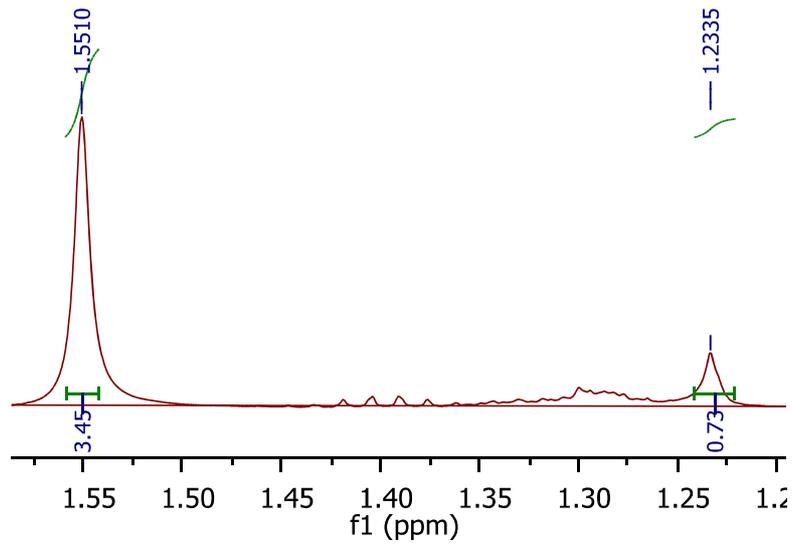


Figura 32: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

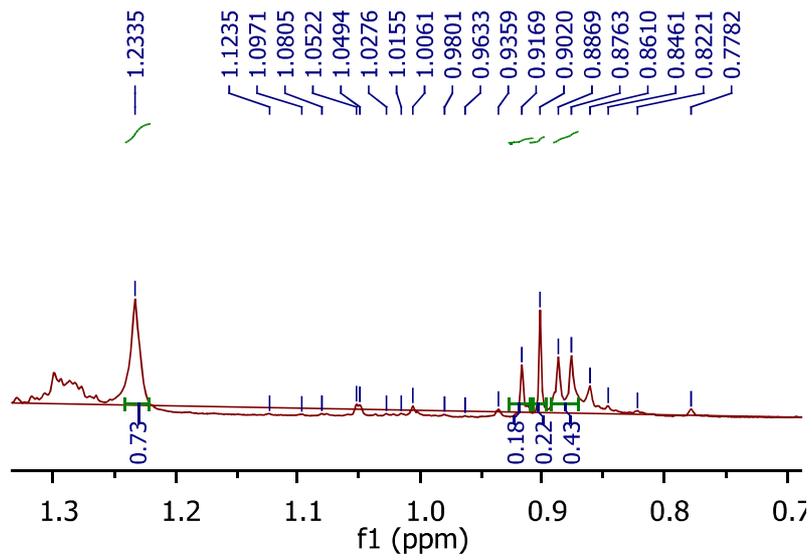


Figura 33: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F20.

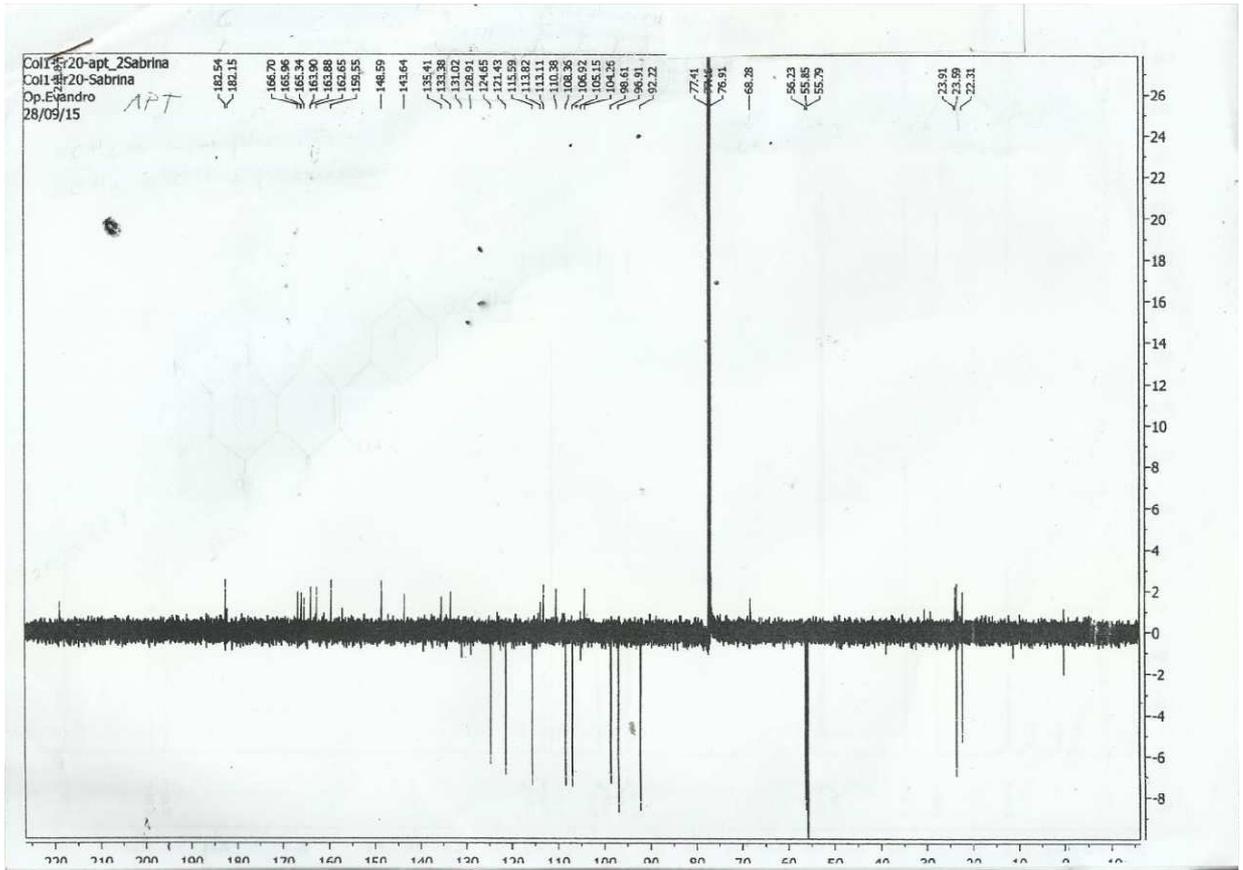


Figura 34: Espectro de RMN ¹³C de F20 (125 MHz, CDCl₃)

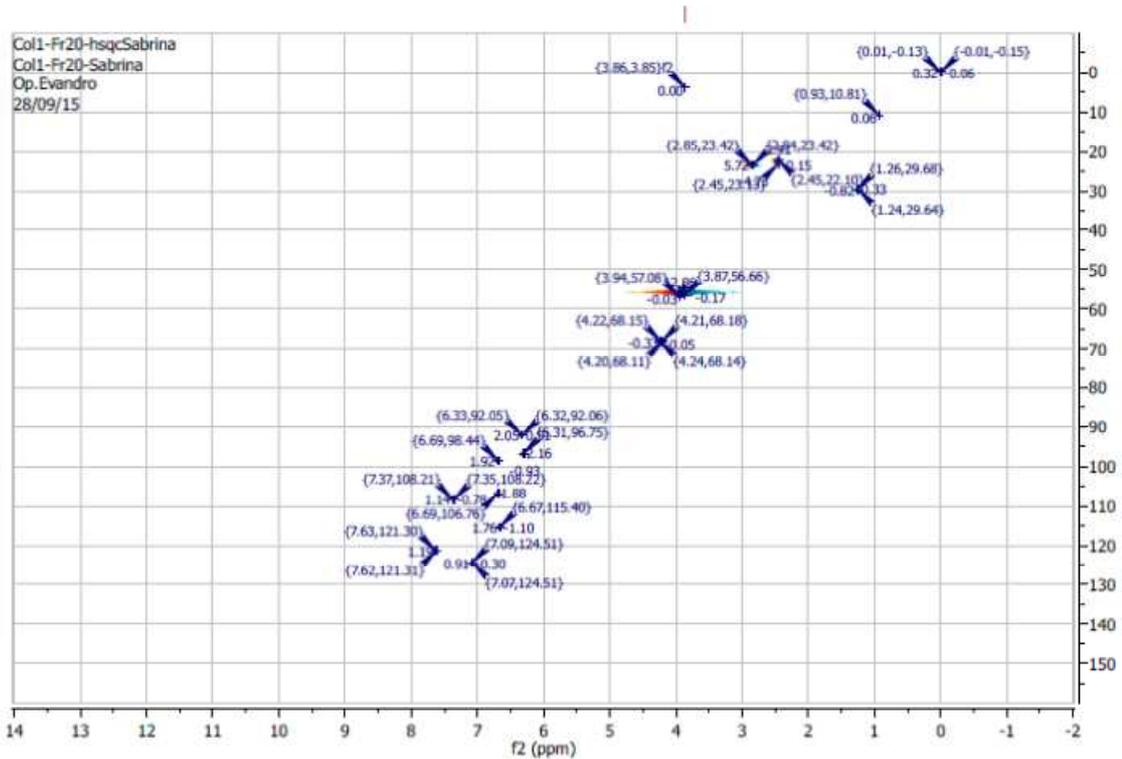


Figura 35: Mapa de contorno HSQC de F20

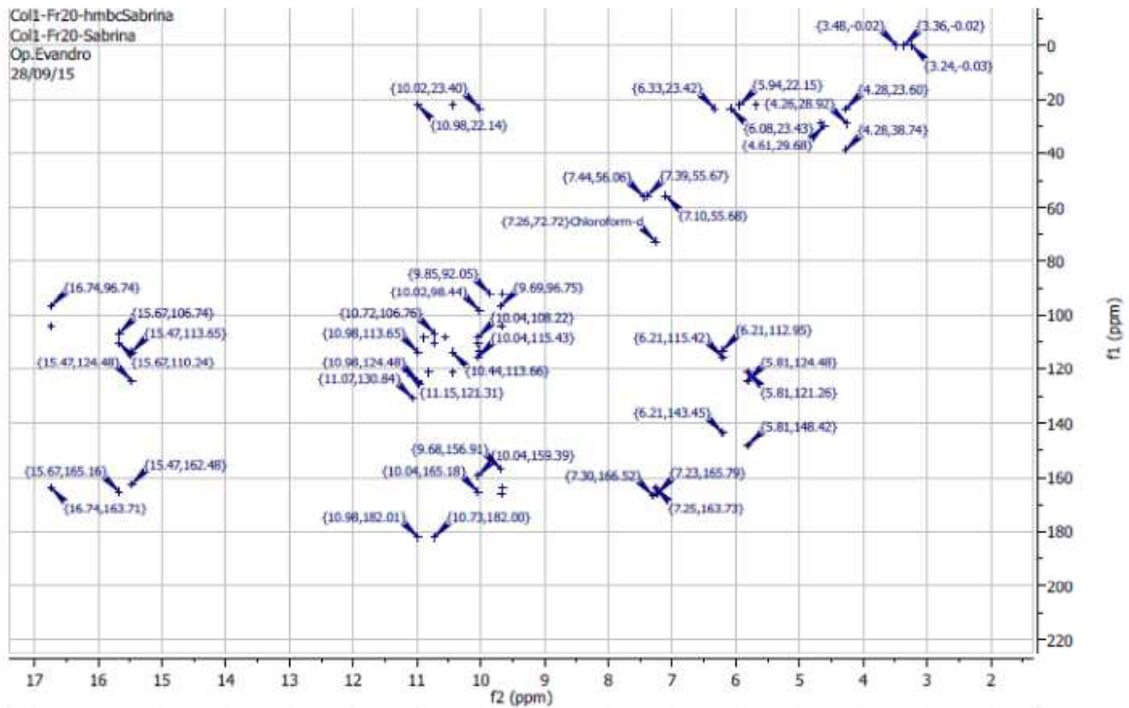


Figura 36: Mapa de Contorno HMBC de F20

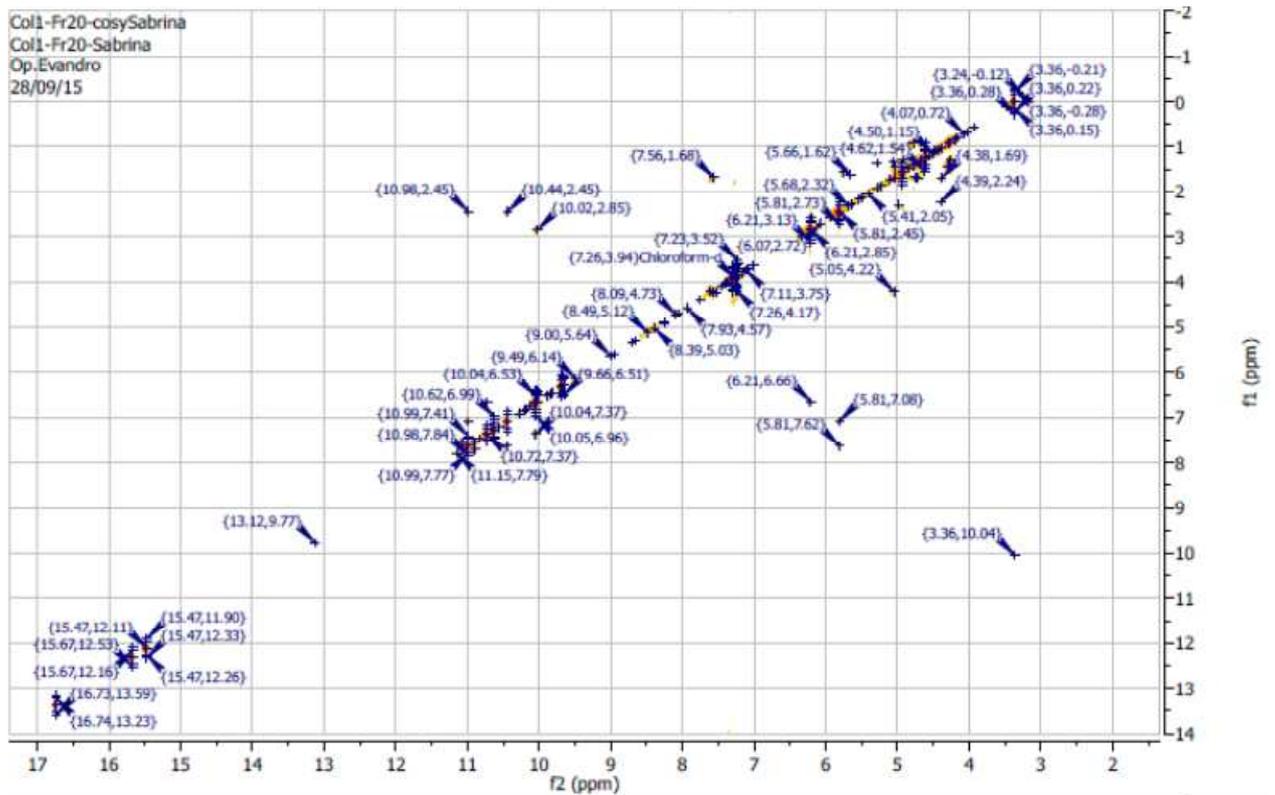


Figura 39: Mapa de Contorno Cosy de F20

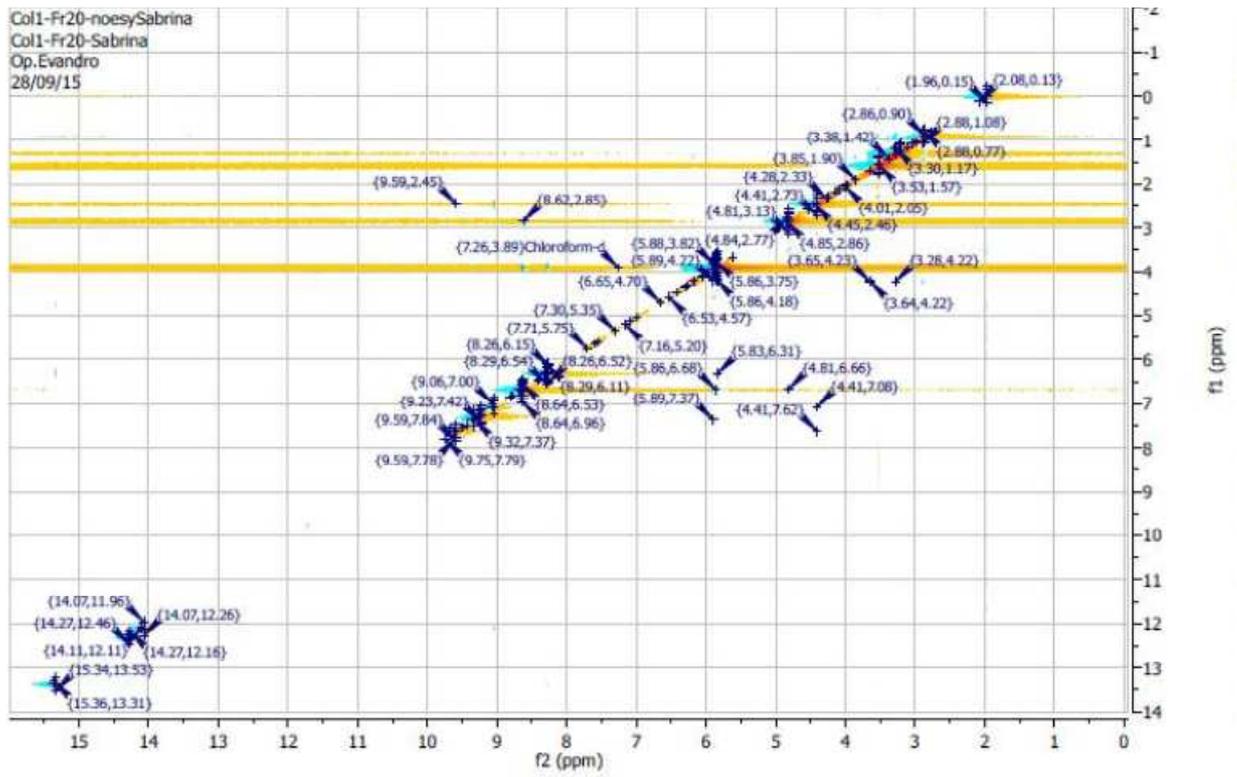


Figura 40: Mapa de Contorno Noesy de F20

- **Identificação dos triterpenos lupeol e β -amirina (F26):**

Na análise dos dados do espectro de absorção na região do infravermelho de F26 (figura 41, página 108) foi possível visualizar bandas em 3309 cm^{-1} sugestiva de estiramento axial de grupamento O-H de álcool. A natureza alifática desta hidroxila foi confirmada pela presença de banda de estiramento C-O de álcoois em 1036 cm^{-1} . Também destacam-se as bandas de estiramento C-H de metila em 2948 cm^{-1} e 2871 cm^{-1} e de estiramento C-H de carbono metileno em 2852 cm^{-1} (SOBRINHO et al., 1991; SILVA, 2013). Observou-se também sinais em 1635 cm^{-1} referentes ao estiramento assimétrico de C=C. Já as bandas em 1464 e 1380 cm^{-1} são referentes a deformação das ligações C-H de grupos metileno e metila, respectivamente. A banda em 881 cm^{-1} é referente ao dobramento fora do plano da ligação C-H de vinila (PAVIA, 2012; SILVA, 2013).

Quanto ao espectro de RMN de ^1H (500 MHz, CDCl_3) de F26 (figuras 42-47, páginas 109-111), foi possível observar sinais sugestivos de hidrogênios olefínicos em δ_{H} 5,18 (t, $J=3,6\text{Hz}$, 2H); δ_{H} 4,68 (d, $J=2,4\text{Hz}$, 1H) e δ_{H} 4,56 (dd, $J=1,4$ e $2,5\text{Hz}$, 1H) e em δ_{H} 3,22 (dd, $J=4,6$ e $11,12\text{Hz}$, 1H) e 3,19 (m, 1H) sinais característicos de hidrogênios ligados a carbonos carbonílicos, além de um sinal em δ_{H} 2,38 (td, $J=5,85$ e $11,5\text{Hz}$, 1H). Na região compreendida entre δ_{H} 2,02 e 1,2 foi possível visualizar um envelope de sinais que,

juntamente com os sinais em δ_H 1,14-0,72, característicos de hidrogênios metílicos, sugerem uma mistura de triterpenos na amostra. Os sinais em δ_H 4,69 e 4,57, que caracterizam a presença de uma ligação dupla exocíclica (Figura 48), em conjunto com o sinal em δ_H 2,39 e δ_H 3,22 permitem sugerir a presença de um triterpeno da série dos lupanos (SILVA et al., 2013) (tabela 4, página 106).

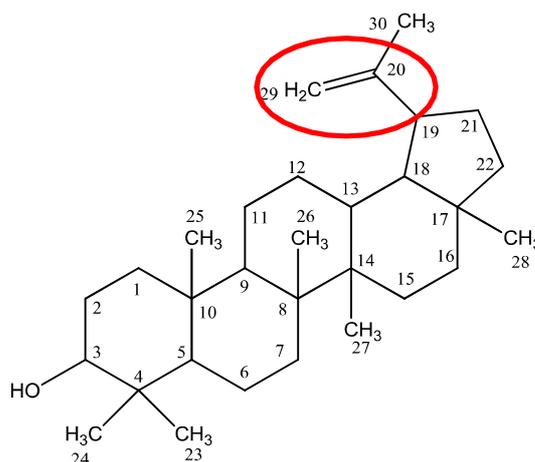


Figura 48: Estrutura do lupeol (SILVA et al., 2013).

Já a presença do sinal em δ_H 5,18 (H-12) caracteriza o segundo composto da mistura como sendo a β -amirina, pertencente à série dos oleananos (LIMA et al., 2004) (Figura 49) (tabela 5, página 107).

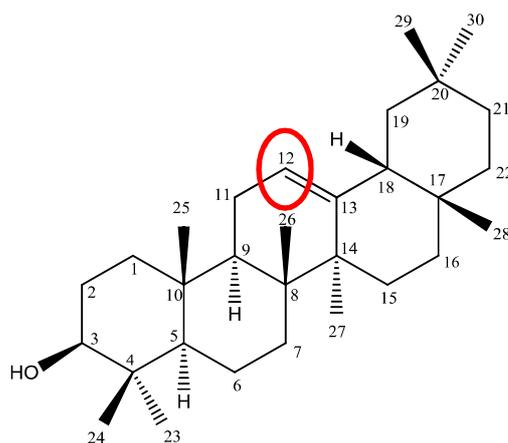


Figura 49: Molécula da β -amirina (Fonte: (LIMA et al., 2004)).

A α -amirina, da série dos ursanos, apresenta um deslocamento químico menor para esse sinal, devido ao efeito gama-protetor da metila na posição 29, ausente na β -amirina (MARINHO, 2008) (figura 50).

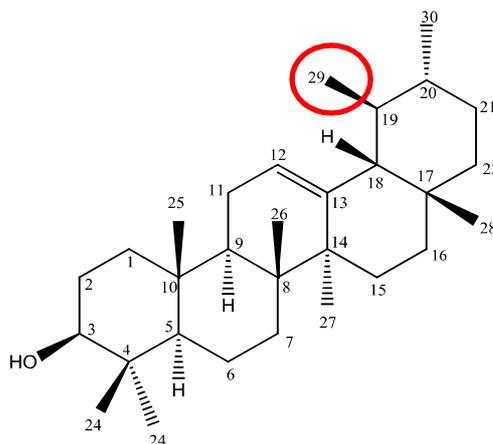


Figura 50: Molécula da α -amirina (Fonte: MARINHO, 2008).

O sinal em δ_H 3,19 foi sugerido para H-3 e a integral de dois hidrogênios para o H-12, sugere uma correlação de duas moléculas de β -amirina para uma molécula de lupeol (LIMA, 2004; MARINHO, 2008; BALESTRIN, 2008).

No espectro de RMN de ^{13}C (125 MHz, $CDCl_3$) de F26 (Figuras 51 e 52, página 112) foram visualizados 59 sinais. Os sinais em δ_C 109, 47 e 151,12 podem ser atribuídos aos C-29 e C-20 do lupeol, além dos sinais em δ_C 48,14 e δ_C 79,16 para as posições 19 e 3, respectivamente (Figura 53). O sinal em δ_C 79,16 foi atribuído a três sinais de carbonos, correspondente a carbonos oxigenados em C-3 (Figura 53). Este valor de deslocamento químico indica que a hidroxila esta posicionada em equatorial na configuração C-3- β -OH (Figura 53) (LIMA, 2004; MARINHO, 2008; BALESTRIN, 2008) (tabela 4, página 106).

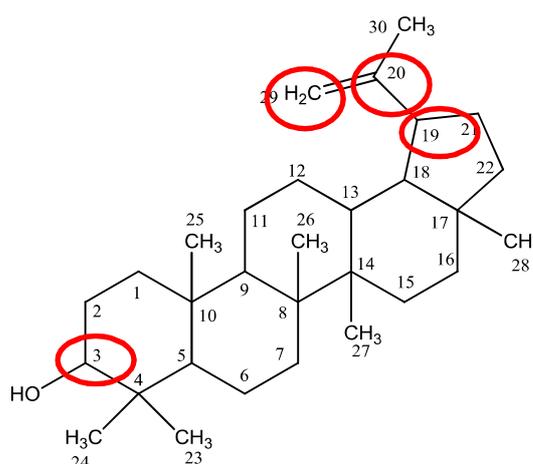


Figura 53: Molécula do Lupeol (Fonte: LIMA, 2004; MARINHO, 2008).

Todos os outros sinais foram atribuídos de acordo com dados obtidos da literatura, presentes na tabela 4 (página 106).

Para a β -amirina foi possível inferir que os sinais δ_C 121,87 e 145,34 foram fundamentais para diferenciar a β -amirina da α -amirina (LIMA, 2004; BALESTRIN, 2008). No espectro de RMN de 1H e ^{13}C foram visualizados quatro sinais em δ_H 1,94 (dt, $J=5,0$ e $13,5Hz$, 1H) e 1,76 (dt, $J=4,5$ e $13,5Hz$, 1H) e em δ_C 26,2 e 26,1, respectivamente, o que permitiu defini-los para as posições 15 e 16, respectivamente (Figura 54) (tabela 5, página 107).

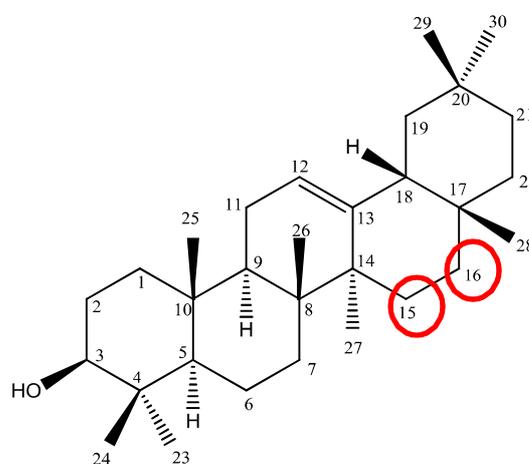


Figura 54: Molécula da β -amirina (Fonte: LIMA, 2004; MARINHO, 2008).

Os sinais em δ_H 1,85 (dt, $J=3,0$ e $7,0Hz$, 1H)/ δ_C 37,1 foram definidos para a posição 22. Os sinais em δ_C 47,39; 46,99; 31,24; 34,89 e 37, 11, atribuídos às posições 18, 19, 20, 21 e 22, reforçam a presença de β -amirina (Figura 55) (tabela 5, página 107).

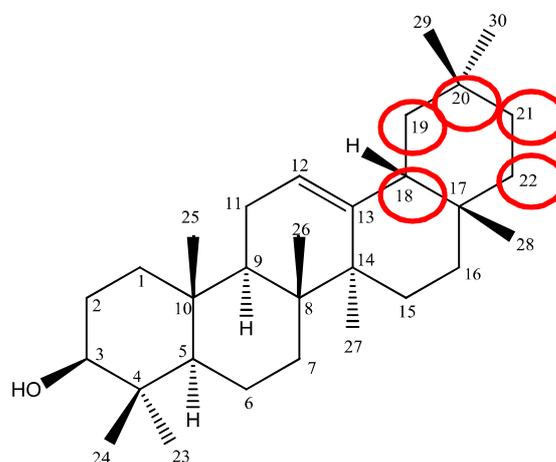


Figura 55: Molécula da β -amirina (Fonte: LIMA, 2004; MARINHO, 2008).

Todos esses sinais, juntamente com os outros valores de RMN de ^1H e ^{13}C e através de comparação com dados da literatura (LIMA, 2004; MARINHO, 2008; BALESTRIN, 2008), permitiram identificar na mistura, além da β -amirina, também o triterpeno lupeol (tabelas 4 e 5, páginas 106 e 107).

Tabela 4: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) composto lupeol de F26 (mistura de triterpenos).

N ^o do C	$\delta^{13}\text{C}$ (ppm)			$\delta^1\text{H}$ (ppm)	
	F26	Lupeol (MARINHO, 2008)		F26	Lupeol (MARINHO, 2008)
01	38,8	38,7	CH ₂	--	--
02	27,39	27,4	CH ₂	--	--
03	79,16 [#]	78,9 [#]	CH	3,19 (m, 1H) [#]	3,19 (m) [#]
04	38,7	38,8	C _o	--	--
05	55,3	55,3	CH	--	--
06	18,5	18,3	CH ₂	--	--
07	34,8	34,2	CH ₂	--	--
08	40,1	40,8	C _o	--	--
09	50,6	50,4	CH	--	--
10	37,3	37,1	C _o	--	--
11	21,0	20,8	CH ₂	--	--
12	26,1	25,1	CH ₂	--	--
13	38,0	38,0	CH	--	--
14	42,9	42,8	C _o	--	--
15	27,4	27,4	CH ₂	--	--
16	35,7	35,5	CH ₂	--	--
17	42,9	42,9	C _o	--	--
18	48,1 [#]	48,2 [#]	CH	--	--
19	46,99	47,0	CH	2,38 (td, J=5,85 e 11Hz, 1H) [#]	2,39 (td J=11,5 e 5,85 Hz) [#]
20	151,1 [#]	150,9 [#]	C _o	--	--
21	---	29,8	CH ₂	--	--
22	39,9	39,9	CH ₂	--	--
23	27,6	27,9	CH ₃	0,79 (s)	0,77 (s)
24	15,5	15,3	CH ₃	0,83 (s)	0,84 (s)
25	16,1	16,1	CH ₃	0,96 (s)	0,97 (s)
26	15,7	15,9	CH ₃	1,02 (s)	1,02 (s)
27	14,7	14,5	CH ₃	0,94 (s)	0,95 (s)
28	--	17,9	CH ₃	0,79 (s)	0,80 (s)
29a	109,4 [#]	109,3 [#]	CH ₂	4,56 (dd, J=1,4 e 2,5 Hz, 1H) [#]	4,57 (dd, J = 2,4 e 1,0 Hz) [#]
29b	109,4 [#]	109,3 [#]	CH ₂	4,68 (d, J=2,4 Hz, 1H) [#]	4,69 (d, J = 2,4 Hz) [#]
30	--	19,3	CH ₃	1,67 (s)	1, 69 (s)

Obs: o símbolo # refere-se a sinais prioritários para identificação da molécula. Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

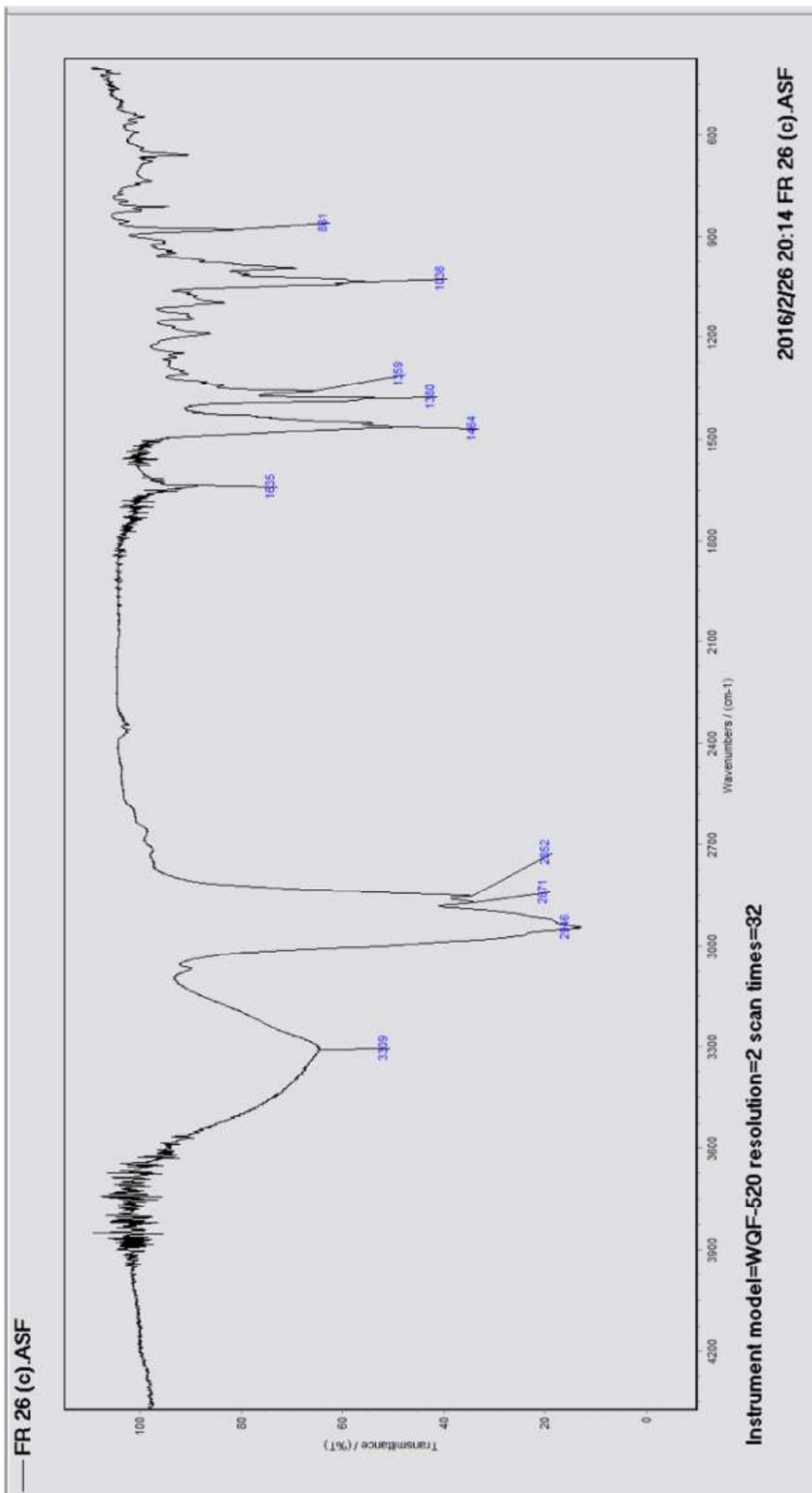
Tabela 5: Dados de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) e ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) do composto β -amirina de F26 (mistura de triterpenos).

N $^{\circ}$ do C	δ ^{13}C (ppm)			δ ^1H (ppm)	
	F26	beta-amirina (BALESTRIN, 2008)		F26	beta-amirina (BALESTRIN, 2008)
01		38,7	CH2	--	--
02		27,2	CH2	--	--
03	79,1#	79,0#	CH	3,22 (dd, J=4,6 e 11, 12 Hz, 1H)#	3,25 (m)#
04	38,9	38,9	CO	--	--
05	55,3	55,1	CH	--	--
06	18,4	18,3	CH2	--	--
07	32,6	32,6	CH2	--	--
08	38,9	38,9	CO	--	--
09	47,7	47,6	CH	--	--
10	--	36,9	CO	--	--
11	23,6	23,5	CH2	--	--
12	121,7#	121,7#	CH	5,18 (t, J=3,6 Hz, 2H)#	5,19 (t, J = 3,50 Hz)#
13	145,1#	145,2#	CO	--	--
14	41,8	41,7	CO	--	--
15	26,2	26,1	CH2	1,94 (dt, J=5,0 e 13,5Hz, 1H)#	1,94 (dt, J=5,0 e 13 Hz)#
16	26,1	26,9	CH2	1,76 (dt, J=4,5 e 13,5 Hz, 1H)	1,74(dt, J=4,5 e 13 Hz)
17	32,6	32,5	CO	--	--
18	47,3#	47,2#	CH	--	--
19	46,9#	46,8#	CH2	--	--
20	31,2#	31,1#	Co	--	--
21	34,8#	34,7#	CH2	--	--
22	37,1#	37,1#	CH2	1,85 (dt, J=3,0 e 7,0 Hz, 1H)	--
23	28,2	28,1	CH3	--	--
24	15,7	15,6	CH3	--	--
25	15,6	15,5	CH3	--	--
26	16,9	16,8	CH3	--	--
27	--	25,9	CH3	--	--
28	28,5	28,4	CH3	--	--
29	33,5	33,3	CH3	--	--
30	23,6	23,6	CH3	--	--

Obs: o símbolo # refere-se a sinais prioritários para identificação da molécula.

Os valores em parênteses representam a multiplicidade e as constantes de acoplamento em Hz, respectivamente.

Figura 41: Espectro de absorção na região do infravermelho (IV) (pastilhas de KBr) de F26 (lupeol, alfa-amirina e beta-amirina).



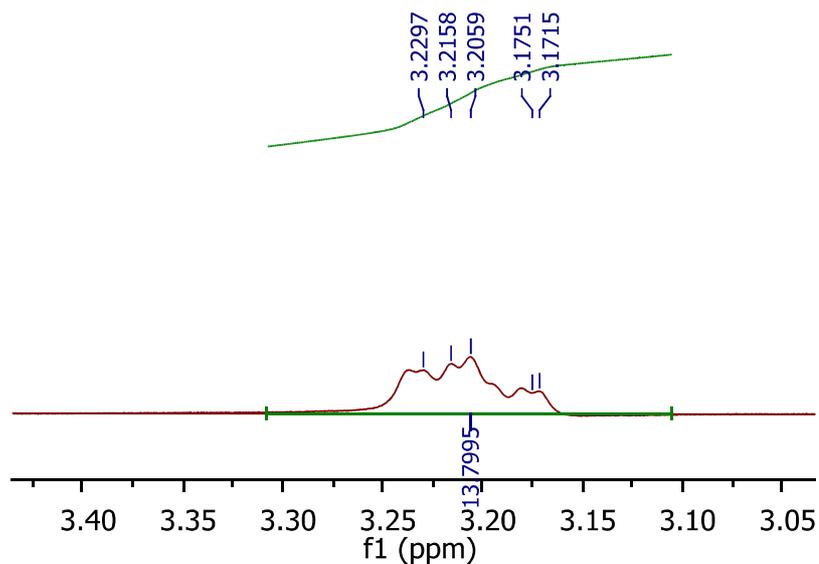


Figura 44: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26

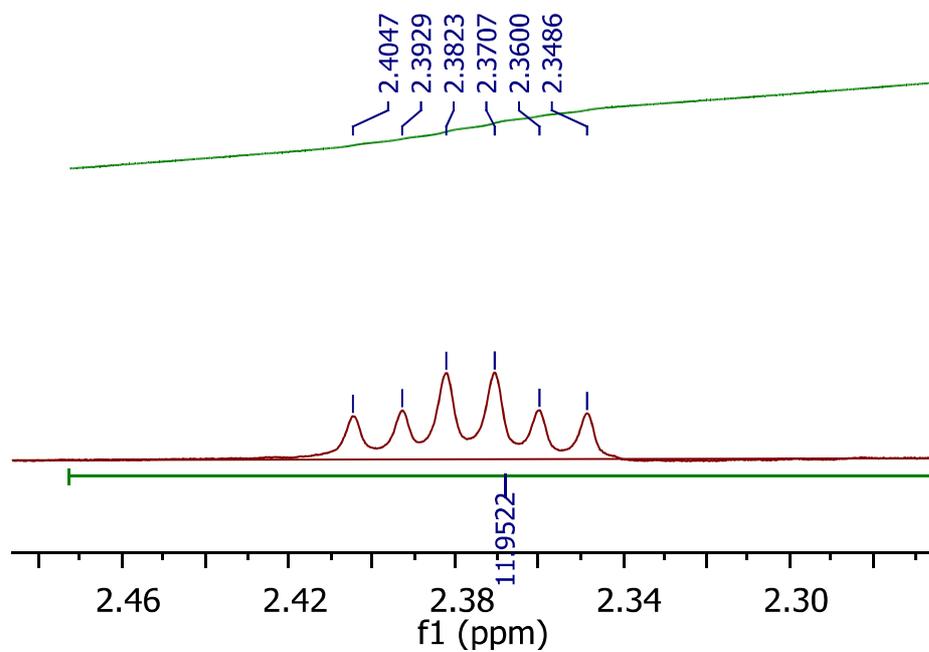


Figura 45: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26

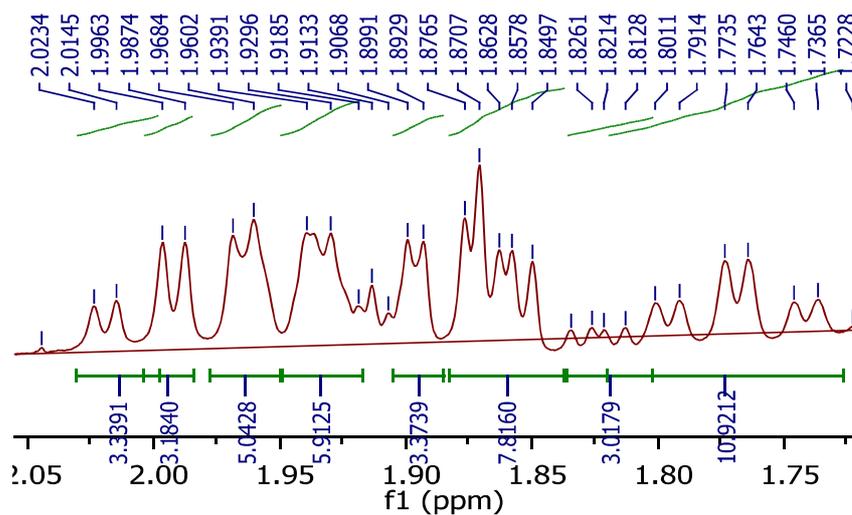


Figura 46: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26

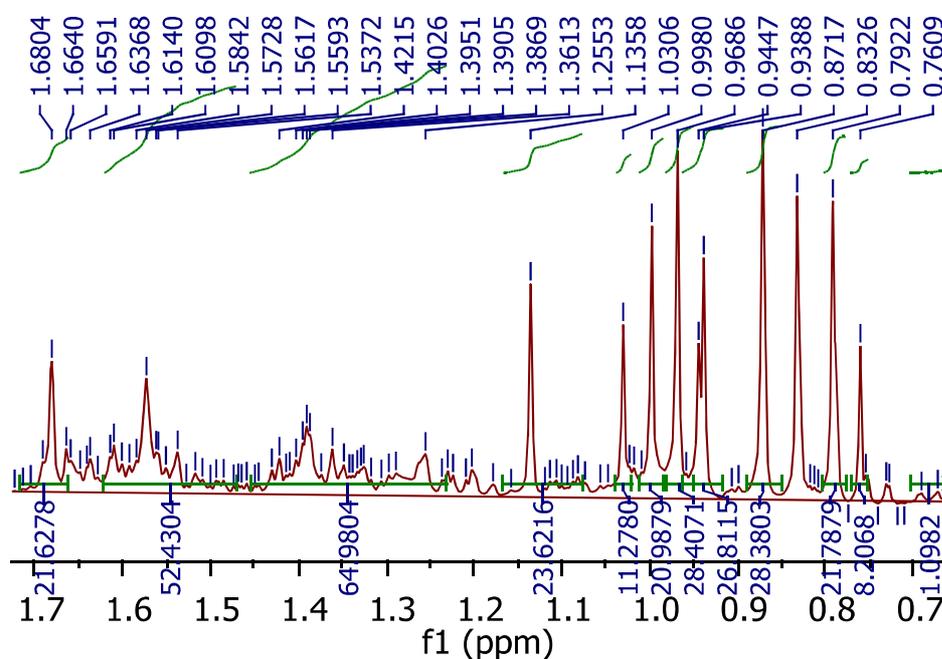


Figura 47: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CDCl_3) expandido da fração F26

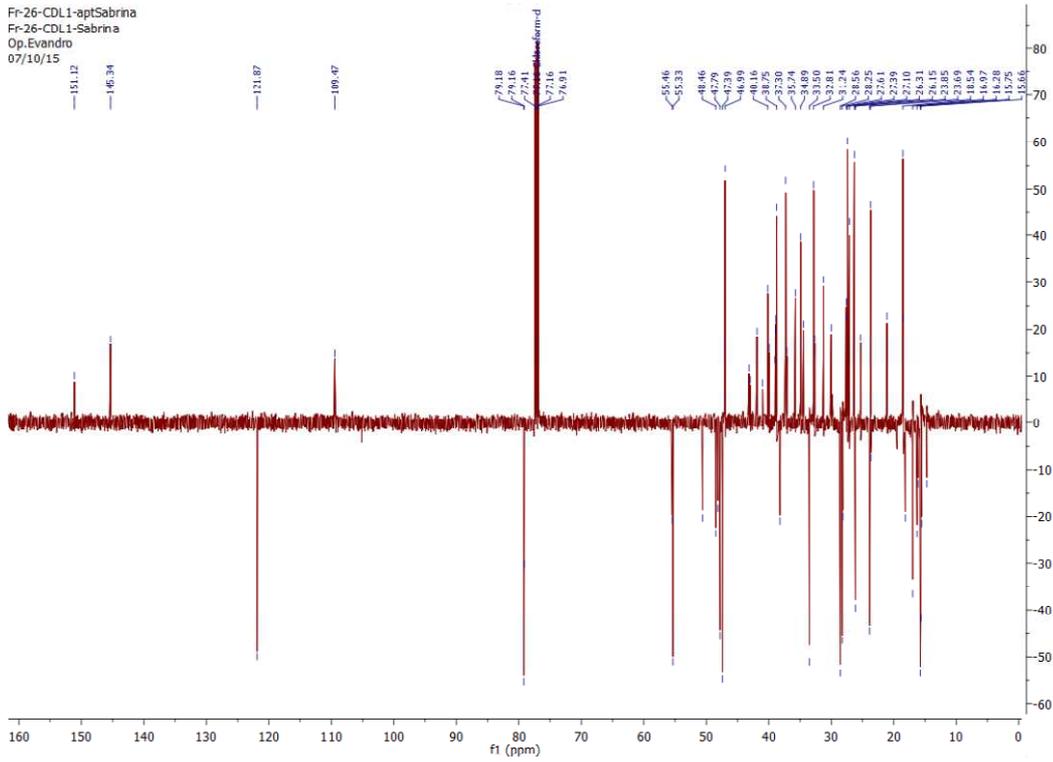


Figura 51: Espectro de RMN ¹³C de F26 (125 MHz, CDCl₃)

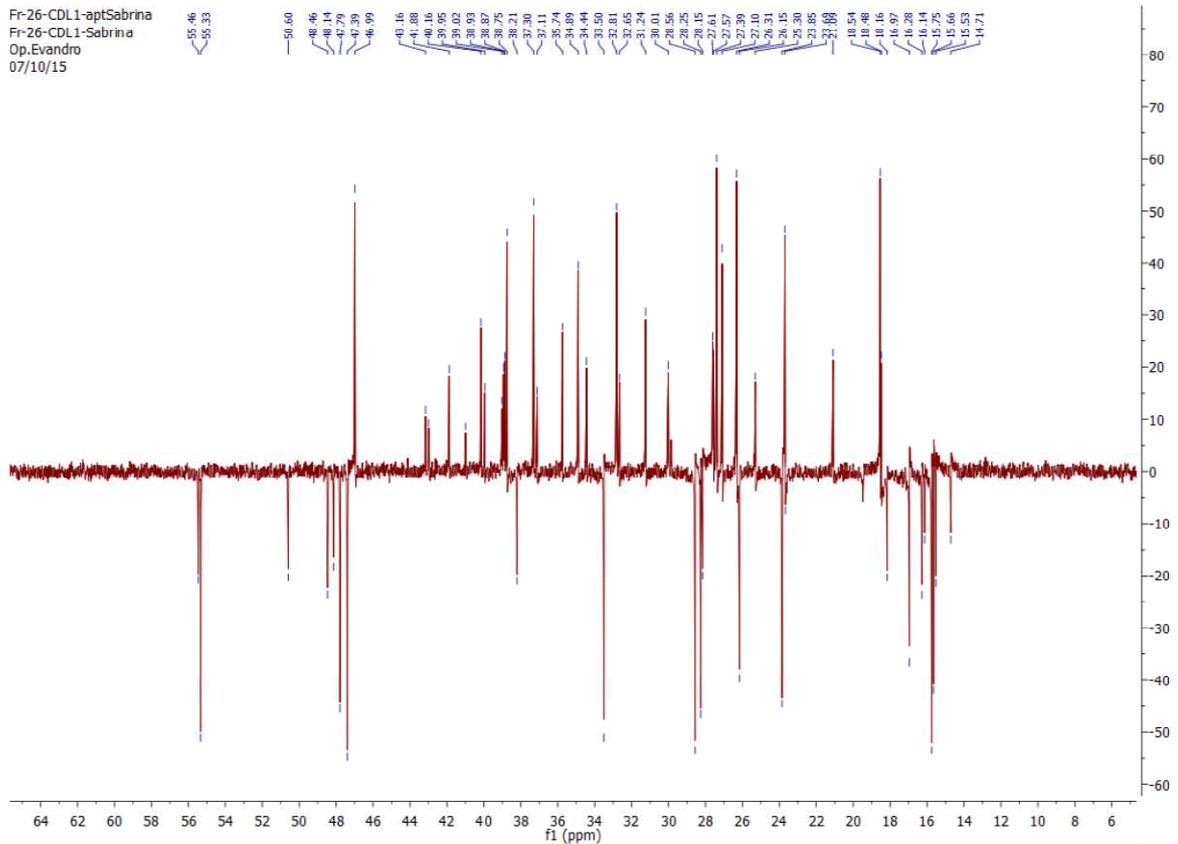
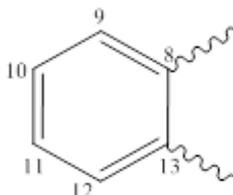


Figura 52: Espectro de RMN ¹³C de F26 (125 MHz, CDCl₃).

• **Identificação dos alcaloides 15-metoxipirifolidina e 15-metoxiaspidospermina (R3):**

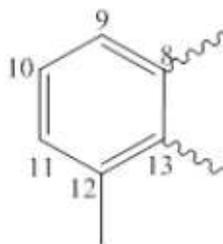
Quanto à fração R3 o espectro de massas de baixa resolução obtido pela técnica ESI-EM modo positivo, mostrou sinais de m/z em 415,45 e 385,44, que juntamente com o espectro ^{13}C -APT, tornou possível propor para o composto as fórmulas estruturais $\text{C}_{24}\text{H}_{35}\text{N}_2\text{O}_4$ e $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{N}_2\text{O}_3$.

O espectro de RMN ^1H (500 Hz, CD_3COCD_3) (figuras 56-60, páginas 119 a 121) apresentou cinco sinais relativos a hidrogênios aromáticos em δ_{H} 7,16 (t, $J=8$ e 15 Hz, 1H), δ_{H} 7,08 (d, $J=8,0$ Hz, 1H), δ_{H} 7,02 (d, $J=8,0$ Hz, 1H), δ_{H} 6,82 (dd, $J=8$ Hz, 2H) e δ_{H} 6,82 (dd, $J=8$ Hz, 2H).

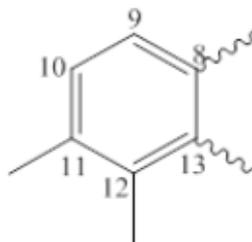


No espectro de RMN ^{13}C -APT (125 Hz, CD_3COCD_3) (Figuras 61-63, páginas 121 e 122) foram visualizados sinais entre 134 e 6,59 ppm, entre eles 4 carbonos metílicos, 7 carbonos metilênicos e 6 carbonos metínicos. Os sinais em δ_{C} 134, 127 e 110 mostraram a presença de carbonos pertencentes a anel aromático.

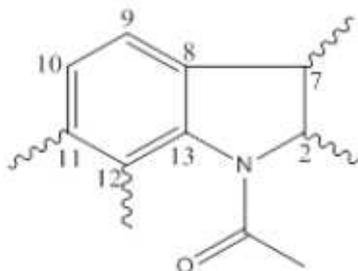
O mapa de correlação HSQC (figura 64, página 123) mostrou a seguintes correlações: δ_{H} 6,82 (dd, $J=8,2$ Hz, 1H)/ δ_{C} 110,45 (C-11) e δ_{H} 7,16(d, $J=8,0$ Hz, 1H)/ δ_{C} 127,21 (C-10), sugestivos de núcleo aromático trissubstituído.



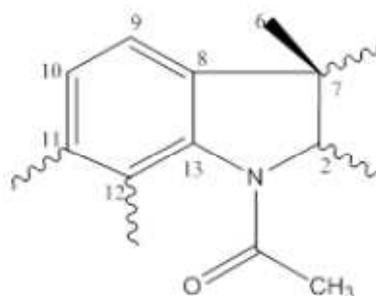
Já os sinais em δ_{H} 7,08/ δ_{C} 117,41 (C-9) e δ_{H} 7,02/ δ_{C} 113 (C-10) são sugestivos de anel aromático tetrassubstituído.



Foram verificados sinais em δ_C 170,52 e δ_C 169,84, referentes a carbonos de grupos carbonílicos ligados a nitrogênio de anel indólico. De acordo com o mapa de correlação heteronuclear HMBC (figura 65, página 123), foram vistos os seguintes sinais: δ_C 170,52/ δ_H 2,04 e δ_C 168,84/ δ_H 2,19, confirmando a presença de dois sinais para grupos carbonílicos ligados ao anel indol.

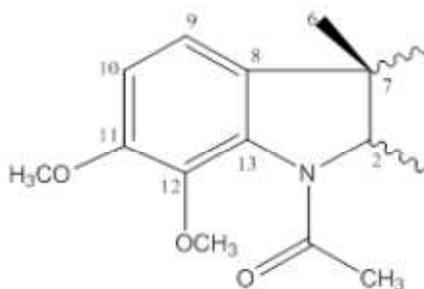


Foi visto também um sinal em δ_C 53,31, característico de carbono quaternário de anel indólico em C-7.

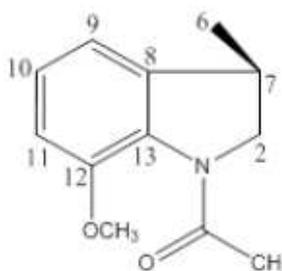


As posições dos outros sinais referentes a carbonos que compõem o anel indólico foram estabelecidos em comparação com a literatura.

Foram vistos sinais em δ_C 150,11 e 154, característicos de carbonos metoxilados. De acordo com o mapa de correlação HMBC (figura 65, página 123), pode-se atribuir os sinais δ_C 154,7/ δ_H 3,87 (C-11), δ_C 154,9/ δ_H 3,84 (C-12), correspondentes às metoxilas que compõem o núcleo aromático tetrassubstituído.



Já o sinal em δ_C 150,36/ δ_H 3,87 corresponde à metoxila que compõe o núcleo aromático trissubstituído.



O mapa de correlação HMBC mostrou também hidrogênios de grupo metoxila ligado ao carbono C-15 em δ_C 56,89/ δ_H 3,31.

O espectro de RMN 1H (500 Hz, CD_3COCD_3) (figuras 56-60, páginas 119-121) mostrou sinais a δ_H 0,67 (t, $J=7,5$, 3H)/ δ_C 6,59 (C-18) e δ_H 0,68 (t, $J=7,2$, 3H)/ δ_C 29,9 (C-19), bem como um sinal múltiplo em 1,28 (m), correspondente a um grupamento etila ligado a um átomo de carbono sp^3 tetra substituído.

Os demais sinais referentes ao composto foram atribuídos de acordo com a literatura (tabela 6). A massa molecular obtida em 415, associada aos dados espectrais tornou possível a identificação do alcaloide indólico monoterpenoide da classe dos plumeranos, denominado 15-metoxipirifolidina (figura 66), tendo presente em sua estrutura um núcleo aromático tetrassubstituído (tabela 6, página 117) (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO E VIEIRA, 2012).

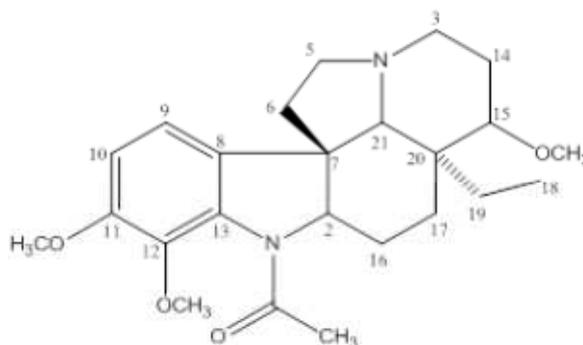


Figura 66: alcaloide 15-metoxipirifolidina isolado da fração R3

A ausência do grupamento metoxila na posição C-11 da 15-metoxipirifolidina, mostra uma estrutura de massa molecular 385, que de acordo com os dados obtidos corresponde ao composto 15-metoxiaspidospermina (figura 64) (tabela 7, página 117) (GUIMARÃES, BRAZ-FILHO E VIEIRA, 2012).

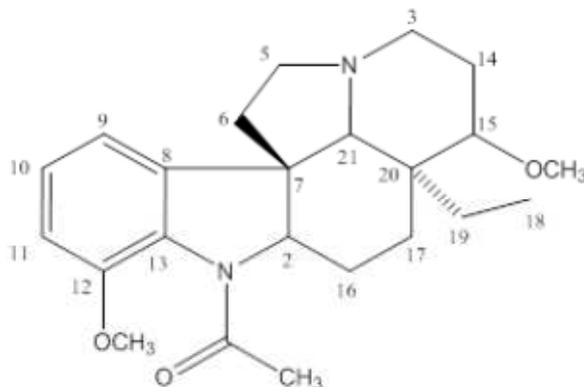


Figura 67: alcaloide 15-methoxyaspidospermina isolado de R3

O isolamento desses dois alcaloides contribuiu para os resultados da avaliação farmacológica, pois permitiu a comprovação de que a fração utilizada para os testes biológicos contém alcaloides indólicos. Ambos os compostos acima já foram isolados da espécie *Aspidosperma pyriformium*.

Tabela 6: Dados de RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 125 MHz) e ^1H (CD_3COCD_3 , 500 MHz) do composto 15-metoxipirifolidina (R3) proveniente da FAT-Ap.

Posição DEPT 135	δ_{C} de R3	δ_{C} (GUIMARÃES, 2012) (DIAS, 2012) (OLIVEIRA, 2008)	δ_{H} de R3	δ_{H} (GUIMARÃES, 2012) (DIAS, 2012) (OLIVEIRA, 2008)
2 (CH)	67,35	67,35/71,17	4,84 (dd, J=6,2 e 10,7 1H)	4,71 (q, 1H)
3 (CH ₂)	52,83	52,9	3,20 (m)	3,26 (m)
5 (CH ₃)	52,70	52,8	2,38 (m) 3,45 (m)	2,40 (m) 3,48 (m)
6 (CH ₂)	36,64	38,4	2,05 (m) 1,90 (m)	2,20 (m) 1,80 (m)
7 (C)	53,31	52,6	--	--
8 (C)	141,65	143,4	--	--
9 (CH)	117,9	117,7	7,08 (d, J=8,0 Hz, 1H)	6,65 (d, J=8,0Hz)
10 (CH)	113,45	108,8	7,02 (d, J=8,0 Hz, 1H)	6,82 (d, J=8,06Hz)
11 (C)	154,97	152,7	--	--
12 (C)	154,93	152,7	--	--
13 (C)	127,2	129,5	--	--
14 (CH ₂)	24,0	24,4	2,03 (m) 1,60 (m)	2,10 (m) 1,52 (m)
15 (CH)	74,5	75,5	3,18 (m)	3,22 (m)
16 (CH ₂)	23,05	25,0	1,35 (m) 2,16 (m)	1,25 (m) 2,04 (m)
17 (CH ₂)	22,93	24,0	1,01 (m) 2,16 (m)	1,10 (dq, J=14,7 Hz, 1H) 2,15 (m)
18 (CH ₃)	6,59	6,90	0,67 (t, J=6,9 Hz, 3H)	0,63 (t, J=6,9Hz, 3H)
19 (CH ₂)	29,9	30,0	0,68 (q, J=6,9 Hz, 1H) 1,28 (m)	0,76 (q, J=6,9 Hz, 1H) 1,30 (m)
20 (C)	36,6	35,7	--	--
21 (CH)	71,7	71,5	2,18 (s, 1H)	2,28 (s, 1H)
12-OCH ₃	53,89	53,5	3,99 (s, 3H)	3,90 (s, 3H)
11-OCH ₃	56,89		3,84 (s, 3H)	
15-OCH ₃	57,09	56,3	3,31 (s, 3H)	3,90 (s, 3H)
NCOCH ₃	170,27	171,2	--	--
NCOCH ₃	22,95	23,0	2,21 (s, 2H)	2,21 (s, 2H)

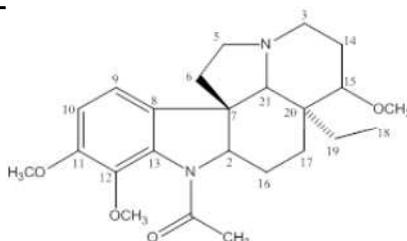
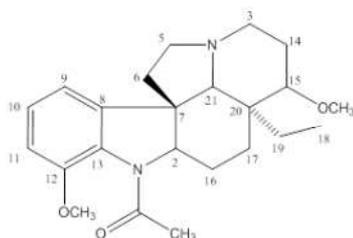


Tabela 7: Dados de RMN ^{13}C (CD_3COCD_3 , 125 MHz) e ^1H (CD_3COCD_3 , 500 MHz) do composto 15-metoxiaspidospermina (R3) proveniente da FAT-Ap.

Posição DEPT 135	δ_{C} de R3	δ_{C} (LIVEIRA, 2008) (DIAS, 2012) (OLIVEIRA, 2008)	δ_{H} de R3	δ_{H} (LIVEIRA, 2008) (DIAS, 2012) (OLIVEIRA, 2008)
2 (CH)	67,35	66,0	4,84 (dd, J=6,2 e 10,7 Hz 1H)	4,70 (q, 1H)
3 (CH ₂)	52,83	53,8	3,20 (m)	3,28 (m)
5 (CH ₃)	52,70	52,8	2,45 (m) 3,38 (m)	2,40 (m) 3,48 (m)
6 (CH ₂)	36,64	37,1	2,05 (m) 1,90 (m)	2,20 (m) 1,80 (m)
7 (C)	53,31	53,7	--	--
8 (C)	141,65	143,3	--	--
9 (CH)	115,62	115,3	6,82 (dd, J=8,0 Hz, 2H)	6,83 (d, J=8,7Hz)
10 (CH)	127,21	126,2	7,17 (t, J=8,0 Hz, 1H)	7,08 (d, J=8,06Hz)
11 (CH)	110,45	111,8	6,82 (dd, J=8,0 Hz, 2H)	6,82 (d, J=8,0 Hz, 2H)
12 (C)	150,11	149,5	--	--
13 (C)	133,51	130,1	--	--
14 (CH ₂)	24,22	24,0	2,03 (m) 1,60 (m)	2,0 (m) 1,76 (m)
15 (CH)	74,5	75,5	3,18 (m)	3,22 (m)
16 (CH ₂)	23,05	24,5	1,35 (m) 2,16 (m)	1,30 (m) 2,04 (m)
17 (CH ₂)	22,93	22,5	1,01 (m) (2,16 m)	1,10 (dq, J=14,7 Hz, 1H) 2,18 (m)
18 (CH ₃)	6,59	6,57	0,67 (t, J=7,5 Hz, 3H))	0,63 (t, J=6,9Hz, 3H))
19 (CH ₂)	29,9	29,9	0,68 (q, J=7,2 Hz, 1H) 1,28 (m)	0,75 (q, J=6,9 Hz, 1H) 1,22 (m)
20 (C)	36,6	35,6	--	--
21 (CH)	71,7	71,6	2,18 (s, 1H)	2,20 (s, 1H)
12-OCH ₃	53,89	53,5	3,87 (s, 3H)	3,90 (s, 3H)
15-OCH ₃	57,09	56,3	3,31 (s, 3H)	3,90 (s, 3H)
NCOCH ₃	169,27	171,2	--	--
NCOCH ₃	22,95	23,0	2,21 (s, 2H)	2,21 (s, 2H)



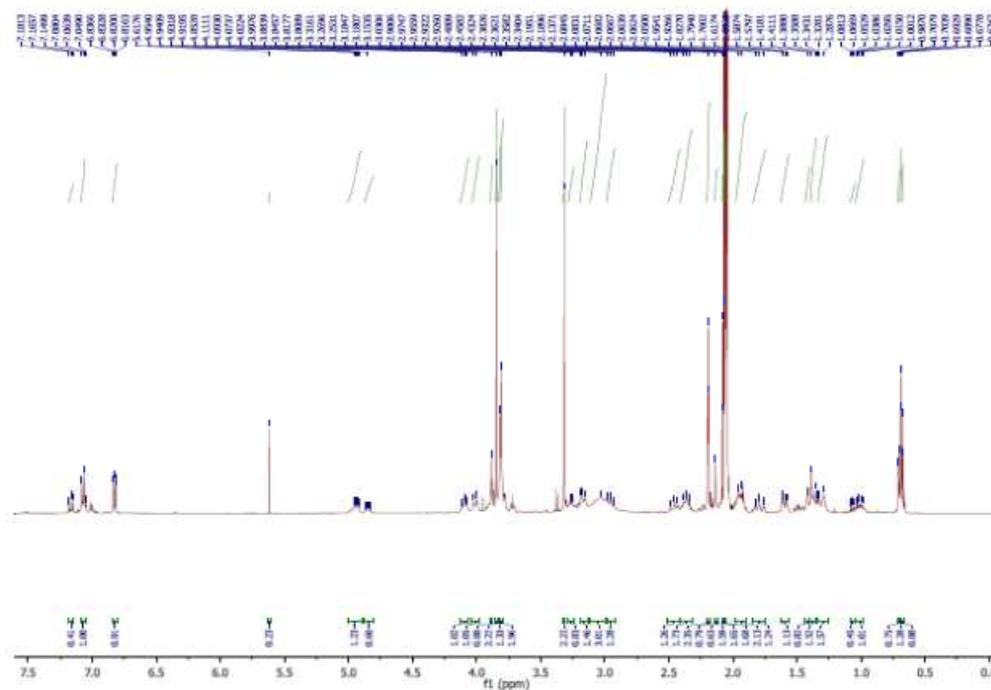


Figura 56: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) da fração R3

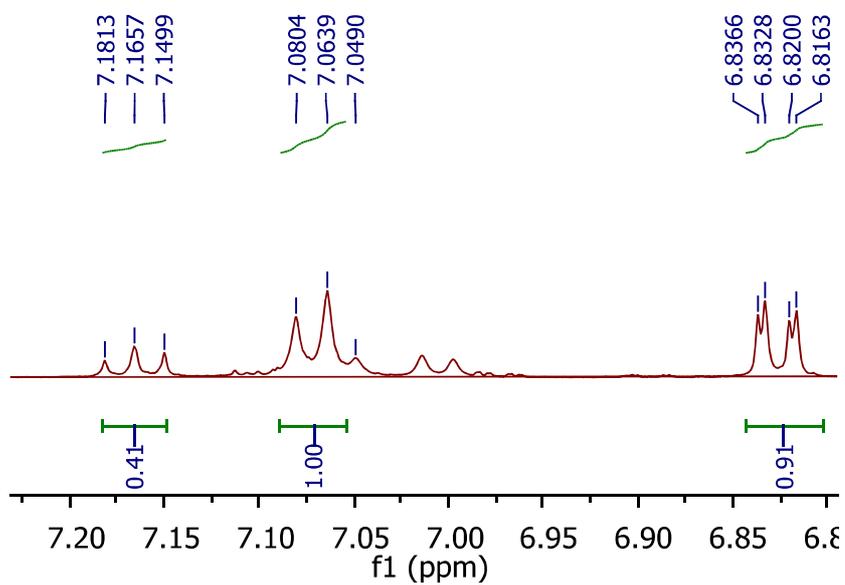


Figura 57: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) expandido da fração R3

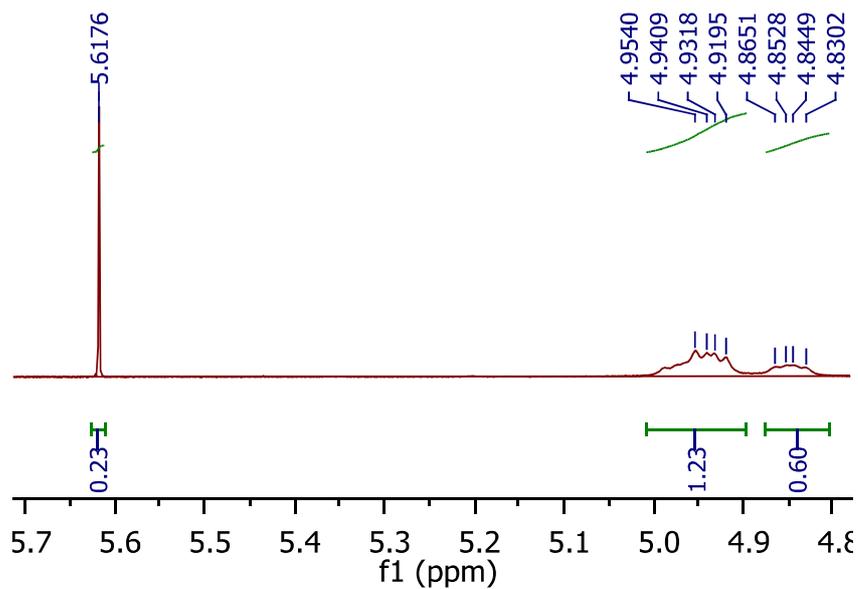


Figura 58: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) expandido da fração R3

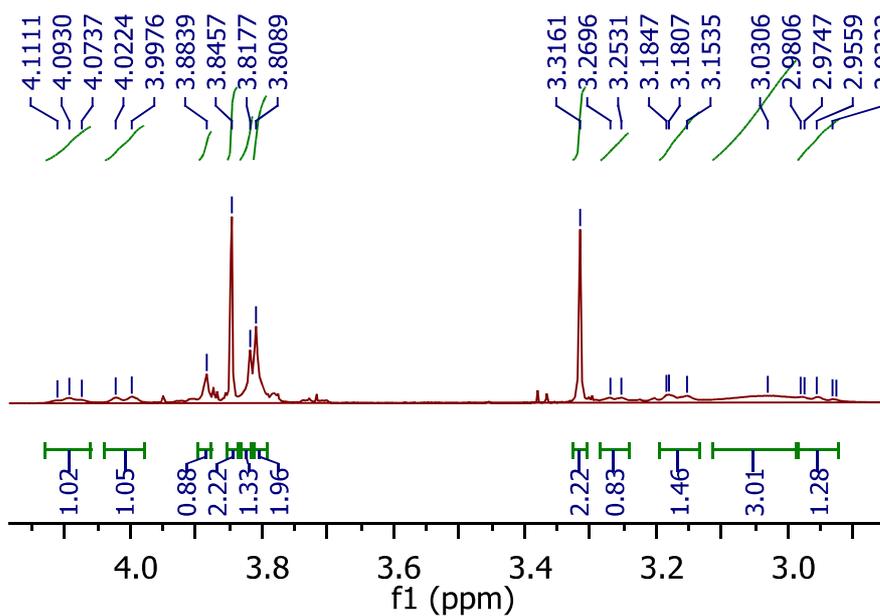


Figura 59: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) expandido da fração R3

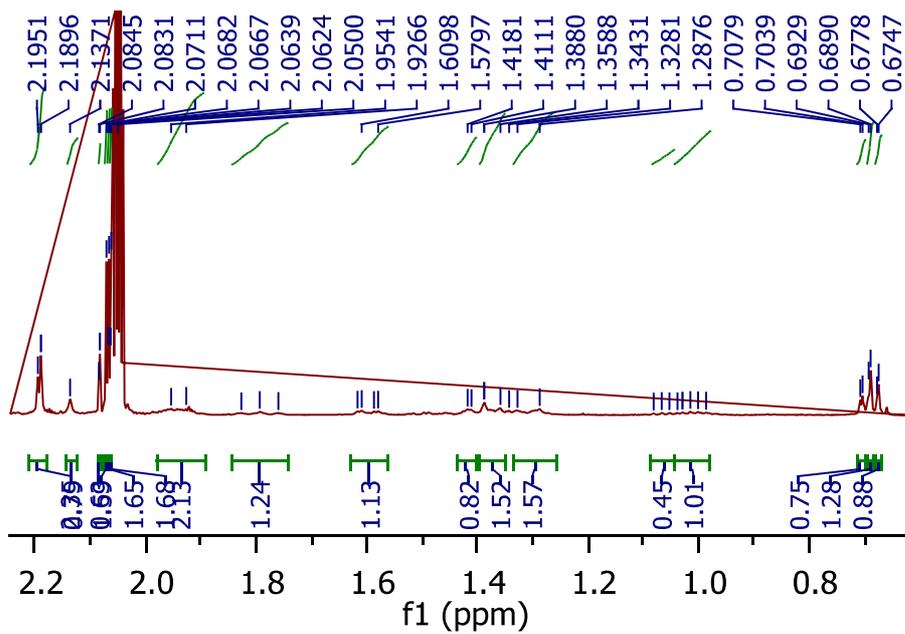


Figura 60: Espectro de RMN ^1H (500 MHz, CD_3COCD_3) expandido da fração R3

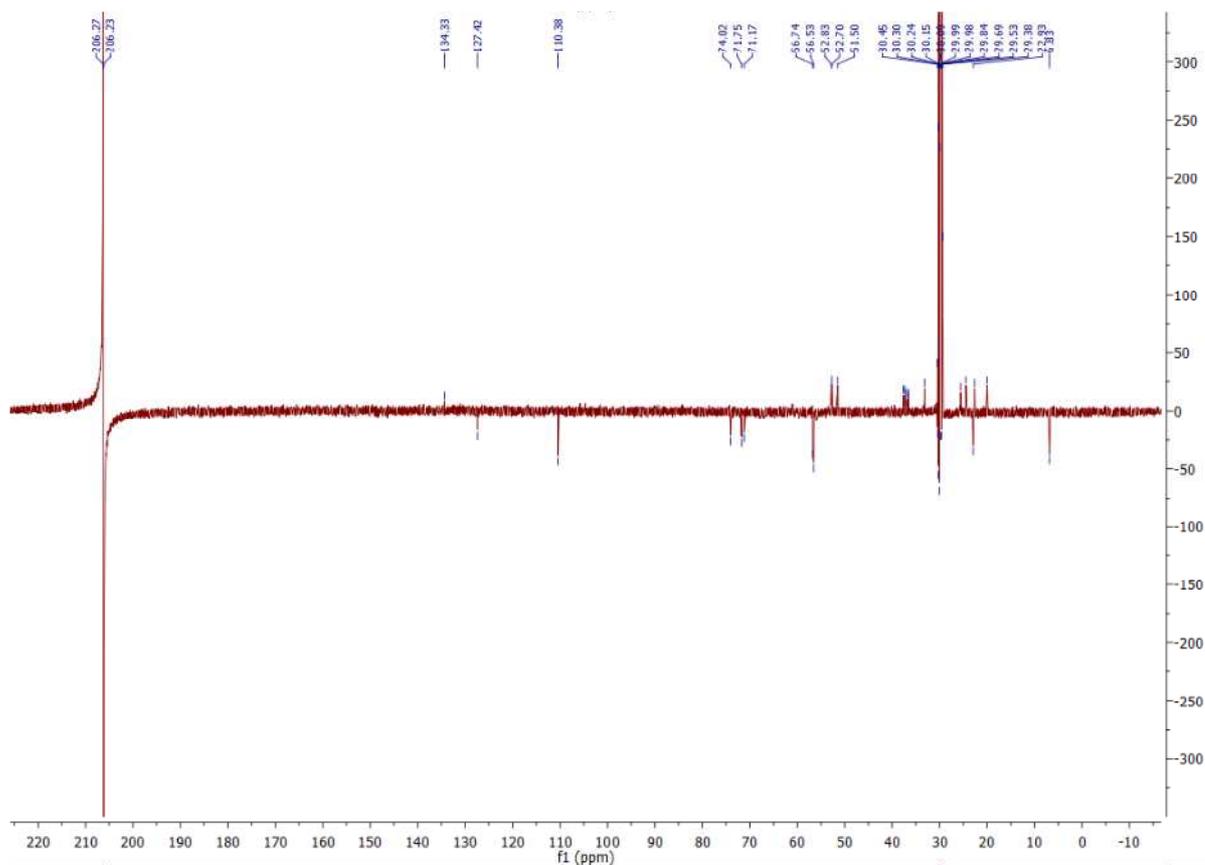
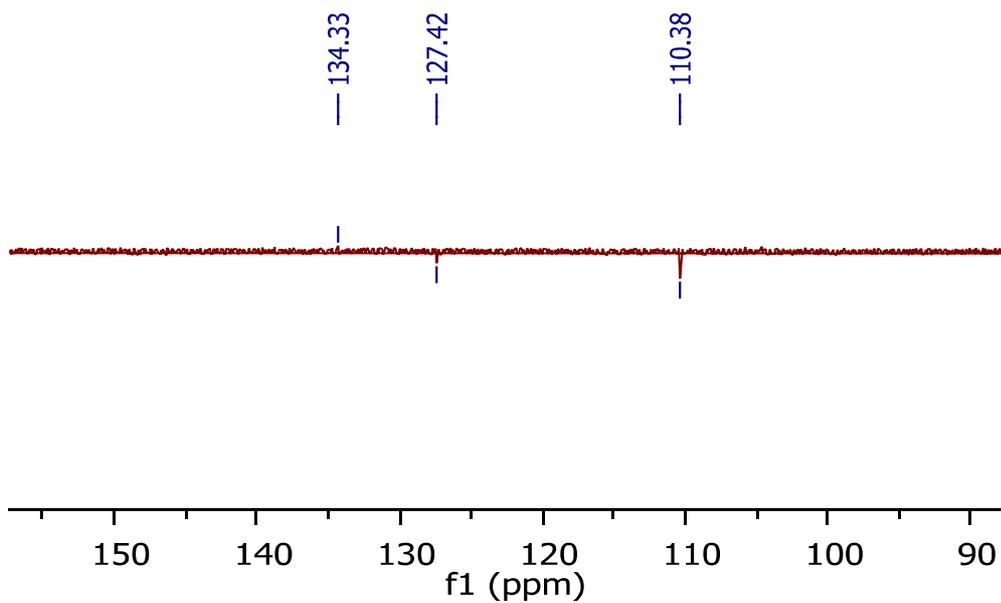
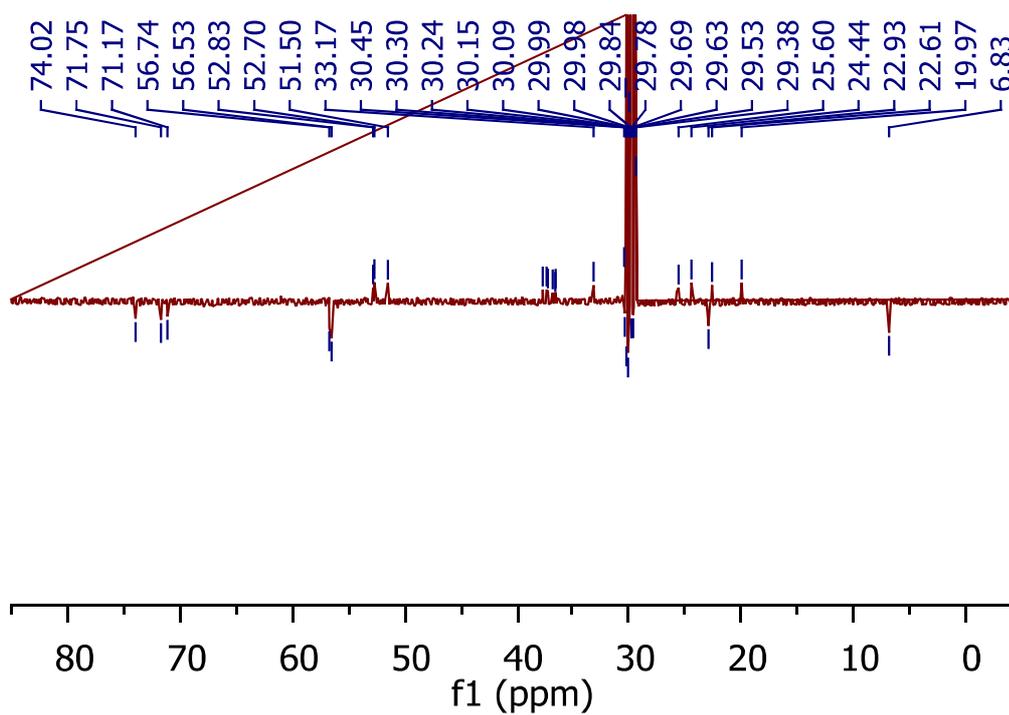


Figura 61: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3COCD_3) de R3

Figura 62: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3COCD_3) de R3Figura 63: Espectro de RMN ^{13}C -APT (125 MHz, CD_3COCD_3) de R3

R3_Sabrina_HmqcHarley
 R3_Sabrina_Harley
 Op-Alexsandro
 11/07/2016

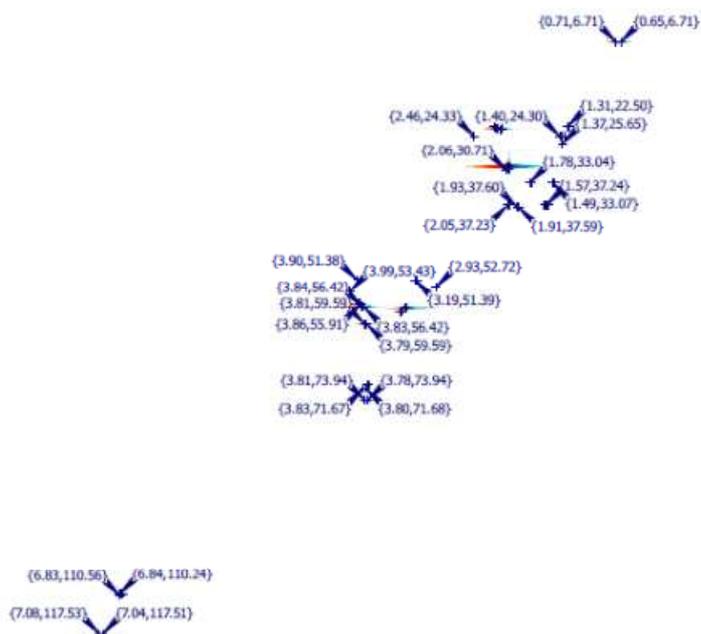


Figura 64: Mapa de Contorno HSQC da fração R3

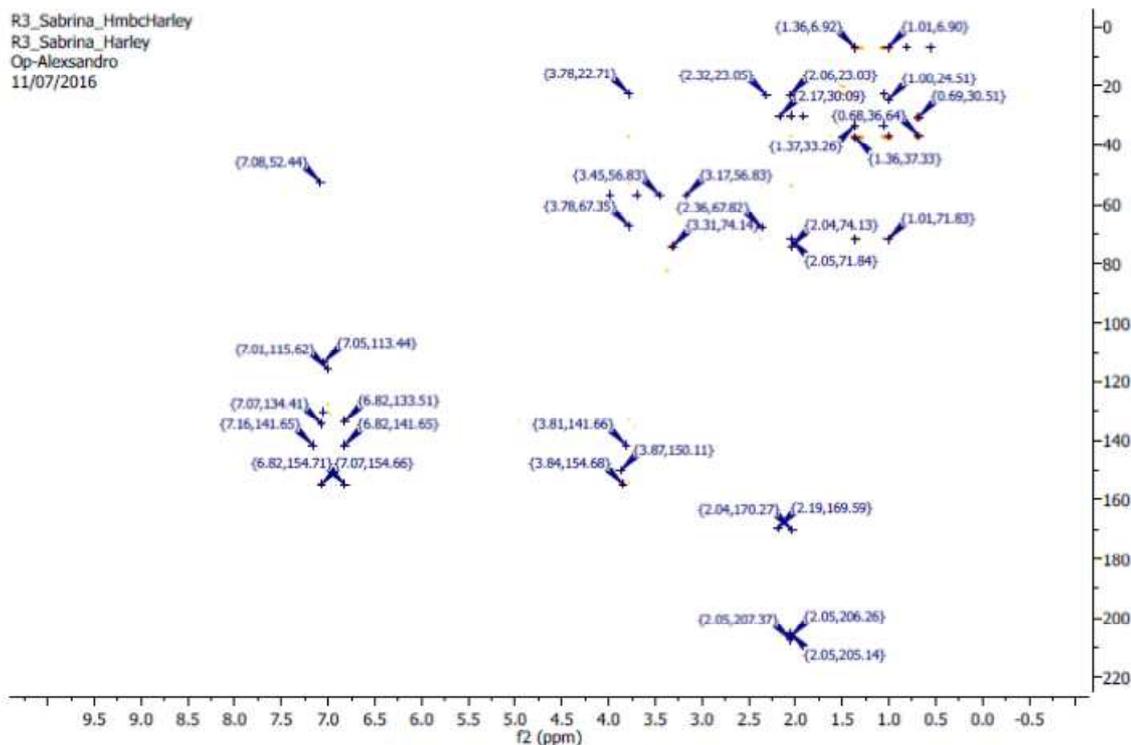
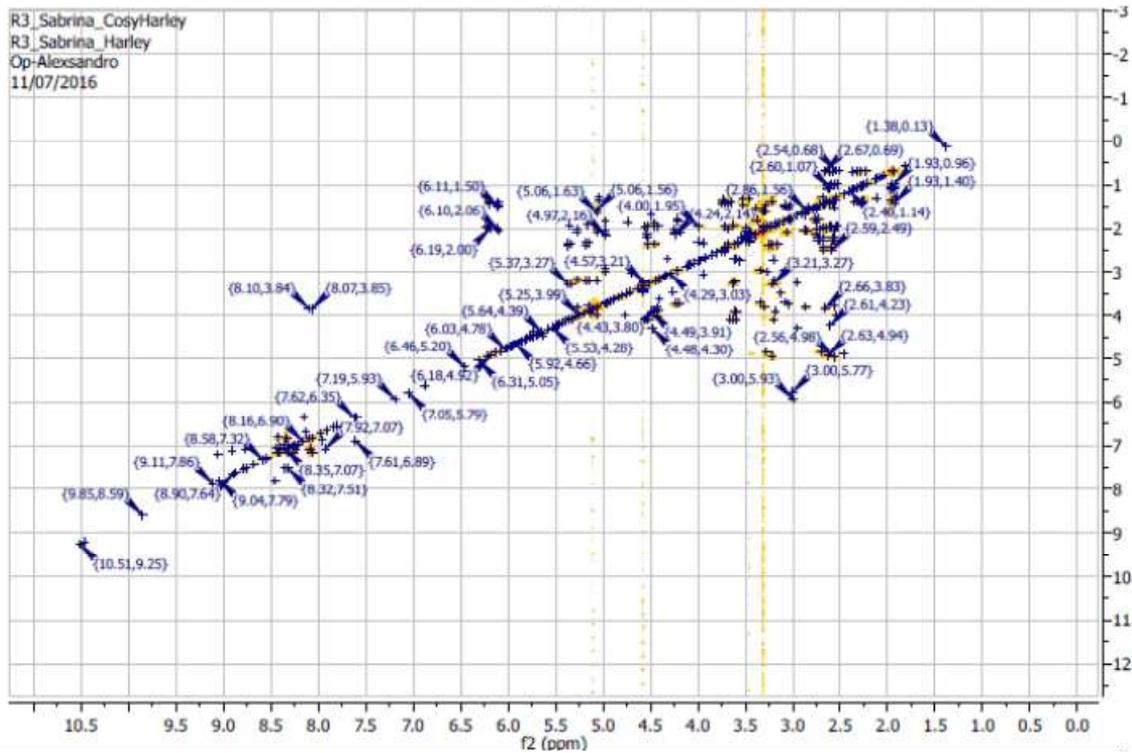


Figura 65: Mapa de Contorno HMBC da fração R3



Fração 68: Mapa de contorno Cosy da fração R3.

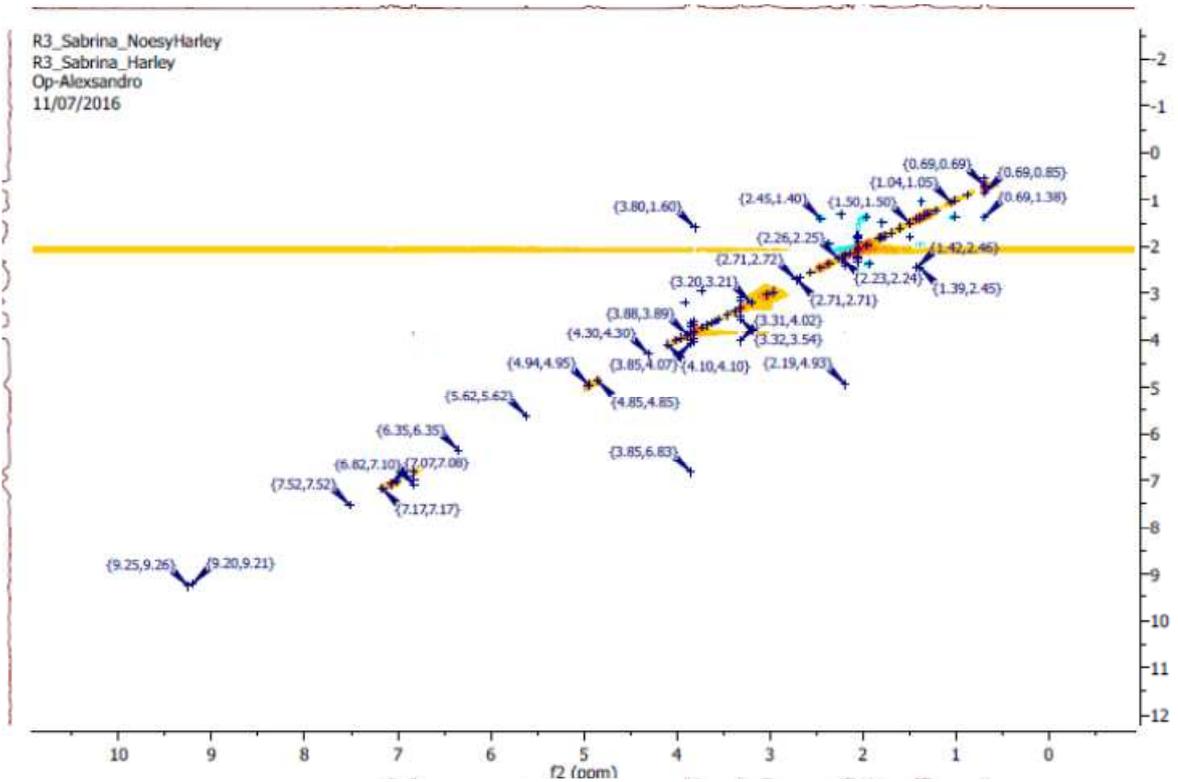


Figura 69: Mapa de Contorno Noesy de R3

4. CONCLUSÕES:

O estudo fitoquímico da fase hexânica do extrato de *A. pyriformium* tornou possível o isolamento e identificação dos compostos paristina (antraquinona) e liquexantona (xantona), ambos isolados pela primeira vez na espécie em questão, bem como o isolamento de dois triterpenos retirados também pela primeira da fase hexânica dessa planta, sendo eles o lupeol e a beta-amirina. Também foi possível o isolamento e a identificação de dois alcaloides indólicos monoterpênicos da classe dos plumeranos, retirados da fração de alcaloides totais (FAT-Ap): 15-metoxipirifolidina e 15-metoxiaspidospermina, corroborando com os dados da literatura e servindo como base para fundamentar os estudos farmacológicos, que por sua vez associam a presença de alcaloides indólicos à várias atividades biológicas, entre elas anti-inflamatória e anti-nociceptiva.

REFERÊNCIAS:

- BALESTRIN, L.; DIAS, J. F. G.; MIGUEL, O. G.; DALL’STELLA, D. S. G.; MIGUEL, M. D. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 18, n. 2, p. 230-235, Abr./Jun. 2008.
- DE ASSIS, C. M.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; CAMPOS, I. P. A.; SUFFREDINI, I. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcaloides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 626-631, Abr./Jun, 2009.
- DIAS, J. F. G. Fitoquímica e ensaios biológicos do extrato bruto etanólico, frações e substâncias isoladas provenientes das cascas de *Geissospermum vellosii* Allemão (APOCYNACEAE), **Tese de Doutorado**. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2012.
- LIMA, M. P.; BRAGA, P. A. C.; MACEDO, M. L. ; da Paz Limaa, Patrícia A. de Campos, M.; SILVA, F. G. F.; FERREIRA, G.; FER NANDES, J. B.; VIEIRA, P. C. Phytochemistry of *Trattinnickia burserifolia*, *T. rhoifolia*, and *Dacryodes hopkinsii*: Chemosystematic Implications, **Sociedade Brasileira de Química**, v. 15, n. 3, p. 385-394, 2004.
- MARINHO, R. O. S. Estudo fitoquímico da espécie *Byrsonia seracea* e sua aplicação em dermocosmética. **Dissertação de Mestrado** em Ciências Farmacêuticas da Faculdade de Farmácia do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- MESSIADES, D. M. S. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyriforme* Mart. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, 2014.
- MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A.; LIMA, P. D.; HONDA, N. K. Constituintes químicos de *Parmotrema lichexanthonicum* Eliasaro & Adler – isolamento, modificações estruturais e avaliação das atividades antibiótica e citotóxica. **Quim. Nova**, Vol. 32, No. 1, 12-20, 2009.
- NOGUEIRA, P. C. N.; ARAÚJO, R. M.; VIANA, G. S. B.; ARAÚJO, D. P.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Plumeran Alkaloids and Glycosides from the Seeds of *Aspidosperma pyriforme* Mart. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 11, p. 2108-2120, 2014.
- OLIVEIRA, V. B. Alcaloides indólicos de *Aspidosperma spruceanum* (APOCYNACEAE). **Tese de Doutorado** em produção vegetal, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, Rio de Janeiro, 2008.
- PAES, M. M. Constituintes químicos de *Picramnia ramiflora* (PICRAMNIACEAE). **Dissertação de Mestrado** da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campo dos Goitacazes, Rio de Janeiro, 2012.
- PAVIA, D.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; JAMES, R. V. **Introdução à Espectroscopia**. Ed. Cengage, 2010.

RODRIGUES, J. V. M. Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. Campina Grande-PB, 2015.

SANTOS, P. B. Atividade biológica das folhas do Pereiro (*Aspidosperma pyrifolium* Mart.) e do Angico (*Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *cebil* (Gris.) Alts.) sobre o *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Dissertação – Mestrado em Zootecnia – Sistemas Agrossilvipastoris no Semi-Árido**, UFCG, p. 45, Patos, PB, 2010.

SANTOS, C. S.; REIS, J. S.; LEITE, J. G. T. S.; PAULA, V. F.; BARBOSA L. C.; MACEDO, G. E. L. Constituintes químicos isolados da casca do caule de *Zanthoxylum petiolare* (RUTACEAE). Disponível em <
http://www.ufrgs.br/spmb2012/Trabalhos/3430_1336072029_Resumo_Jamile.pdf>

SILVA, A. O. Estudo fitoquímico, avaliação da toxicidade oral aguda e da atividade anti-inflamatória em vitro e in vivo das cascas de *Parahancornia fasciculata* (Poir.) Benoist (Apocynaceae). Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2013.

SILVA, R. C.; FERNANDES, P. R. D. ; MORAES, A. R.; BIZERRA, A. M. C. SOBRINHO, D. C.; HAUPTLI, M. B.; APOLINÁRIO, E. V.; KOLENZ, C. C. M.; CARVALHO, M. G.; BRAZ-FILHO, R. Triterpenoides Isolated form *Parahancornia amapa*. **Revista Brasileira de Química**, v. 2, n. 15, 1991.

CAPÍTULO 2

LINS, F. S. V. **ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTI-NOCICEPTIVA E TOXICOLÓGICA DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (APOCYNACEAE) EM CAMUNDONGOS.** Campina Grande, PB: UEPB, 2016 (Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas).

1. INTRODUÇÃO

O processo inflamatório é uma reação de reparação e defesa do organismo ao dano tecidual visando diluir, destruir ou isolar o agente lesivo. Este processo induz a liberação de uma gama de mediadores exógenos e endógenos (VIEIRA, 2014 apud KUMMER e COELHO, 2002). Dentro desse mesmo contexto, a dor é definida como “experiência sensorial e emocional desagradável” associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano (TRACEY e MANTYH, 2007).

Tanto a inflamação quanto a dor agem como mecanismos de proteção ao organismo frente a agentes agressores, inibindo comportamentos que podem desencadear injúrias maiores (KLAUMAMM et al., 2008; CORTES et al., 2013; RODRIGUES, 2015 apud SILVA E MACEDO, 2011).

Apesar de existirem várias alternativas farmacológicas com atividade anti-inflamatória e analgésica, é cada vez mais crescente o número de pesquisadores interessados em estudar os mediadores e a fisiopatologia da inflamação, pois os medicamentos disponíveis no mercado possuem eficácia limitada, além de efeitos adversos que podem restringir sua utilização, a exemplo de fármacos que inibem a síntese de prostaglandinas, que apesar de muito utilizados contra processos inflamatórios podem desencadear lesões gástricas. Isso leva à busca de tratamentos mais eficazes e com menos efeitos prejudiciais ao indivíduo (VIEIRA, 2014 apud GRIS et al., 2010).

Com base nisso, o uso de plantas medicinais tem contribuído para o direcionamento de estudos fitoquímicos, biológicos e toxicológicos, servindo como alternativa para substituição de medicamentos já utilizados pela população (LINS, 2013).

O gênero *Aspidosperma* (família Apocynaceae) ocorre desde o México até a Argentina e destaca-se pela ocorrência de alcaloides indólicos. No Brasil, *Aspidosperma pyrifolium* Mart. ocorre principalmente na caatinga nordestina e é conhecida como pereiro,

pau-de-coaru e pequiá da mata. Essa espécie é bastante estudada devido a propriedades anti-inflamatória, analgésica, sedativa, entre outras (NÓBREGA, 2008).

Deste modo, o presente trabalho objetivou a avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e toxicológica de fase não-clínica a partir das cascas do caule de *A. pyrifolium* Mart. em modelos animais.

1. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Local da Pesquisa

Os ensaios toxicofarmacológicos foram realizados no Laboratório de Ensaio Farmacológicos, na Universidade Estadual da Paraíba, em Campina Grande.

2.2. Espécie e material vegetal

A espécie *Aspidosperma pyrifolium* Mart. foi recoletada no sítio Capim Grande, nas proximidades do Distrito de São José da Mata, na cidade de Campina Grande, Paraíba, no mês de agosto de 2014 (coordenadas: S7°13'27,56" – W36°00'53,37"). A exsicata está depositada no herbário Jayme Coelho de Moraes na Universidade Federal da Paraíba (n. 20104) (MESSIADES, 2014).

2.3. Obtenção do extrato bruto:

As cascas de *A. pyrifolium* Mart. foram secas em estufa de circulação de ar (40 °C ± 1 °C) e pulverizadas em moinho de facas com granulometria de 10 mesh. Posteriormente foram submetidas à extração pela técnica de maceração a temperatura ambiente usando etanol a 96% como solvente (planta: solvente 1:5, m/v) durante 15 dias. O extrato obtido foi filtrado e rotaevaporado (TE – 21 da TECNAL), acoplado à uma bomba de vácuo (TE – 0581 da TECNAL), apresentando rendimento final de 19,71%, sendo denominado extrato etanólico bruto de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (EEB-Ap). A partir deste foi realizada uma “marcha sistemática” para obtenção da fração de alcaloides totais de *A. pyrifolium* (FAT-Ap). Esta fração foi escolhida para ser utilizada nos testes biológicos, tendo como base outros estudos que comprovaram a relação entre as atividades analgésica e anti-inflamatória e os alcaloides existentes nesta espécie.

2.3.1. Marcha para obtenção da fração de alcaloides totais:

400 g do EEB-Ap foi submetido a uma marcha sistemática para obtenção de alcaloides a partir das seguintes etapas:

- 300 mL de ácido clorídrico a 1% foram adicionados ao EEB-Ap até atingir pH 3,0-4,0;
- Em seguida a solução foi aquecida em banho-maria por 10 min;
- Após esfriar, a suspensão foi filtrada;
- O filtrado foi alcalinizado com solução de hidróxido de amônio a 10% até pH 10 e posteriormente extraído com clorofórmio até reação negativa com reagente de Dragendorff;
- A fase aquosa basificada foi descartada e a clorofórmica lavada com água, desidratada com Na₂SO₄ anidro, filtrada e evaporada sob pressão reduzida a 55^o C em rotaevaporador, obtendo-se a fração de alcaloides totais de *A. pyrifolium* (FAT-Ap), com rendimento de 2,29% (DI ASSIS et al., 2009).
- Após secagem, 1 mg da FAT-Ap foi pesado e colocado em tubo de ensaio para teste qualitativo com reagente de Dragendorff, formando um precipitado altamente positivo para presença de alcaloides.

2.4. Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss (Mus musculus)* adultos, pesando entre 25 a 35g, de ambos os sexos. Os mesmos foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade controlada, ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas de Campina Grande (FACISA) – Número do Projeto/Protocolo: 5402042015 e CIAEP/CONCEA: 01.001.2012, em 11/06/2015 (Anexo 1).

2.5. Avaliação da toxicidade

2.5.1. Teste de toxicidade aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado na RE N° 90/2004 da ANVISA e no protocolo experimental de Almeida (et al., 1999) e objetivou a avaliação das alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central, autônomo e ocorrência de morte – informação utilizada para determinação da dose letal média (DL₅₀). A escolha das doses levaram em consideração a toxicidade do espécime vegetal (LIMA et al., 2010) e teve como objetivo a determinação de doses seguras para a realização de ensaios farmacológicos.

Deste modo, 48 camundongos adultos (n=6) correspondendo a 8 grupos, sendo 24 machos e 24 fêmeas, foram tratados por via oral (gavagem), com FAT-Ap nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, após prévia diluição em salina 0,9%. Enquanto que, o grupo controle recebeu apenas o veículo (salina) também por via oral.

Após a administração, parâmetros como massa corporal, consumo de água e de ração, e produção de excretas foram avaliados durante 30 min, 1, 2, 4, e a cada 24 horas por 14 dias, bem como, o estado de consciência e a disposição geral, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo.

Por fim, no 15° dia, os animais foram pesados e eutanasiados (ZIMMENANN, 1983). Os órgãos (fígado, baço, coração e rins) foram pesados e avaliados macroscopicamente para verificar alterações no peso e/ou coloração (CUNHA et al., 2013)

2.6. Ensaio farmacológicos

2.6.1. Avaliação da resposta anti-inflamatória

2.6.1.1. Edema de pata induzido por carragenina

Camundongos adultos (grupo n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo (Grupo 1), indometacina (10 mg/kg) (Grupo 2) e FAT-Ap nas doses de 10 mg/kg (Grupo 3), 20 mg/kg (Grupo 4) e 30 mg/kg (grupo 5). Após 30 minutos, foi injetada na região subplatar da pata traseira direita 0,1 mL da solução de carragenina a 1%. A espessura da pata foi medida antes da aplicação da substância pró-inflamatória e de hora em hora, até a quarta hora após o estímulo edematogênico, utilizando paquímetro digital (Figura 70). O efeito antiedematogênico dos grupos tratados foi obtido pela diferença da espessura inicial da pata que recebeu o agente flogístico pela espessura obtida após cada hora (CASTRO, 2003) e o percentual de inibição

foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é a medida do edema do grupo veículo e X os testes ou controle positivo (SANTOS, 2011; WINTER et al., 1962). Após o fim das medições, os animais foram anestesiados e sacrificados.

Para complementar os resultados, a pata direita (que recebeu o agente flogístico) de cada animal foi cortada com tesoura cirúrgica na região tíbio-tarsal para posterior comparação entre os pesos (CELEDONIO, 2014).



Figura 70: Medição da espessura da pata durante experimento (Fonte: dados da pesquisa).

2.6.1.2. Peritonite induzida por carragenina

Camundongos adultos (grupo n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 6 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo (Grupo 1), indometacina (10 mg/kg) (Grupo 2) e FAT-Ap 20 mg/kg (Grupo 3) e 30 mg/kg (grupo 4). Após 30 min, foi injetada uma solução de carragenina a 1% (0,1 mL/10g) na cavidade intraperitoneal dos animais. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados e a cavidade intraperitoneal lavada com 2 mL do tampão fosfato alcalino (pH 7,2), massageando cuidadosamente para diluição das células. Posteriormente esta solução contendo o tampão+células do peritônio foi transferida para tubos de ensaio e desta solução composta por tampão+células do peritônio, 0,02 mL foi coletado e depositado em tubo contendo 0,4 mL de solução de Turk. Após cinco minutos foi realizada a contagem global de leucócitos polimorfonucleares em Câmara de Neubauer (CUNHA et al.,1989).

O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o número de leucócitos do grupo veículo e X os testes ou controle positivo (FERRÁNDIZ et al., 1991).

2.6.2. Avaliação da atividade antinociceptiva:

2.6.2.1. Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Camundongos adultos (grupo n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo (Grupo 1), dipirona 500mg/kg (Grupo 2) e FAT-Ap nas doses de 10 mg/kg (Grupo 3), 20 mg/kg (Grupo 4) e 30 mg/kg (grupo 5). Após 40 minutos, foi injetada uma solução de ácido acético a 1% (0,1 mL/10g) via intraperitoneal. Posteriormente, os animais foram transferidos para funis de vidro transparentes e observados por 20 minutos para se contabilizar o número de contorções abdominais seguido de estiramento dos membros inferiores.

O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o número de contorções do grupo veículo e X os testes ou controle positivo (KOSTER et al., 1959).

2.6.2.2. Nocicepção induzida por formalina

Camundongos adultos (grupo n=6) de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas, foram tratados por via oral com 10 mL/kg do veículo (Grupo 1), indometacina (10 mg/kg) (Grupo 2) e FAT-Ap nas doses de 10 mg/kg (Grupo 3), 20 mg/kg (Grupo 4) e 30 mg/kg (grupo 5). Após 30 minutos foi injetada formalina a 1% (20 μ L) na região subplantar da pata direita (figura 71) e em seguida, os animais foram transferidos para funis de vidro transparentes e a reatividade animal foi observada, sendo registrado o tempo de início e término da ocorrência de lambeduras na pata que recebeu o agente flogístico pelos 5 minutos iniciais (Fase I - neurogênica) e entre 15 e 30 minutos (Fase II - inflamatória) (figura 72). O cálculo foi feito a partir da subtração do tempo final pelo inicial em cada fase ($T_f - T_o$), obtendo dessa forma o tempo em que cada animal passou lambendo a pata que recebeu o agente flogístico. O percentual de inibição foi calculado usando a fórmula: $\text{Inibição} = (V-X)/V \times 100\%$, onde V é o grupo veículo e X os testes ou controle positivo (HUNSKAAR et al., 1987; RODRIGUES, 2015).



Figura 71: – Injeção subplantar de formalina 1% em camundongos (Fonte: OLINDA, 2010).



Figura 72: Teste de formalina em camundongos *Swiss* (Fonte: dados da pesquisa).

2.7. Análise estatística

Os resultados da toxicidade aguda, bem como das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva foram avaliados utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida do pós-teste de Tukey. Todos os resultados foram expressos como média±desvio padrão (d.p.) e o nível de significância mínimo de $p < 0,05$ analisados pelo software *GraphPad Prism 5.0*.

2. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Ensaio de Toxicidade Aguda

A toxicidade de uma substância é a capacidade intrínseca de afetar negativamente ou causar dano a um organismo. Muitos testes são utilizados para avaliar a toxicidade sistêmica aguda, e também para classificar e rotular apropriadamente substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade (LOPES, 2006). Muitas espécies vegetais produzem substâncias capazes de exercer ação tóxica sobre os organismos vivos. É válido ressaltar que muitas plantas são completamente desconhecidas quanto ao potencial de causar intoxicações, sendo a quantidade de plantas potencialmente tóxicas muito elevada (CARVALHO, 2011).

Esses riscos de intoxicação podem ser avaliados por meio de estudos não-clínicos, sejam eles *in vitro* ou *in vivo* e estudos clínicos, subdivididos em fases (1 a 4). Em ensaios não-clínicos *in vivo*, a toxicidade aguda é um dos principais testes com o qual é possível observar sinais de intoxicação, determinar a DL₅₀ e definir doses a serem usadas em estudos posteriores (MESSIADES, 2014; MONTENEGRO, 2011)

O potencial tóxico da espécie *Aspidosperma pyrifolium* já vem sendo destacado por vários produtores em vários estudos no Nordeste brasileiro. Em entrevistas aplicadas aos produtores de 17 municípios do Estado do Rio Grande do Norte, especificamente no Seridó Ocidental e Oriental, na busca de plantas tóxicas dessas localidades, o pereiro foi identificado como uma planta tóxica para bovinos, caprinos e ovinos, provocando aborto ou nascimento de animais débeis. Também foi identificada a ocorrência de intoxicações com alterações no sistema nervoso, caracterizadas por rigidez dos membros posteriores e dificuldade de locomoção em bovinos, muare e equinos, sendo a época de maior ocorrência dessas intoxicações o período de estiagem, pois nesta a espécie ainda está verde e suas folhas estão entre as últimas a cair (SILVA et al., 2006).

Segundo Riet-Correa et al. (2011), na cidade de Patos, Paraíba, essa espécie foi identificada como planta tóxica para caprinos. Os animais abortavam quando ingeriam a espécie em diferentes fases da gestação. Também foi observado que os abortos ocorriam no período seco seguido de chuvas. Quando a planta era consumida nos primeiros 35 a 40 dias de gestação das cabras, ocorriam perdas embrionárias.

A toxicidade aguda dessa espécie também já foi testada em camundongos adultos albinos swiss, com administração intraperitoneal de extrato metanólico da casca. Os resultados da toxicidade demonstraram por via intraperitoneal os seguintes efeitos: agitação,

movimentos estereotipados, piloereção, reação de fuga, irritabilidade, exoftalmia, aumento da frequência cardiorespiratória, tremores grosseiros, contorções abdominais e convulsões (NÓBREGA, 2008).

Lima e Soto-Blanco (2010) realizaram um estudo de toxicidade em ratos e citotoxicidade *in vitro* com extrato etanólico de *A. pyrifolium*. A administração em ratos machos e fêmeas da linhagem Wistar demonstrou que as fêmeas apresentaram redução do peso fetal e fortes indícios de toxicidade materna, além de distúrbios motores e morte nas concentrações mais elevadas. Os ratos machos apresentaram-se mais resistentes do que as fêmeas. No mesmo estudo também foi verificado que o extrato promoveu hemólise e foi letal para o organismo *Artemia salina*.

Messiades (2014), avaliou a toxicidade do EEB das cascas do caule de *A. pyrifolium* em ratos *Wistar* nas doses de 50, 150, 250 e 1000 mg/kg. Nesse estudo houve óbito de dois animais na dose de 1000 mg/kg e de um animal na dose de 250 mg/kg, impossibilitando a determinação da DL₅₀.

A fase alcaloídica (FAT-Ap) (mais concentrada que o extrato bruto) foi testada neste estudo para verificar seu potencial tóxico e partir disto, determinar as doses utilizadas para o estudo farmacológico. Os resultados abaixo, mostram o comportamento dos animais frente a diferentes doses da FAT-Ap (50 mg/kg; 100 mg/kg e 200 mg/kg). Tais resultados foram comparados tanto com o grupo controle negativo (salina) quanto com as doses entre si.

A dose de 200 mg/kg da FAT-Ap foi 100% letal, provocando óbito de todos animais 30 minutos após administração oral. O principal efeito observado antes da morte dos animais foi a presença de tremores intensos, seguidos por convulsão.

A dose de 100 mg/kg da FAT-Ap causou morte de uma fêmea após uma hora de administração e até quatro horas após, todos os animais que receberam esta dose apresentaram baixa resposta ao aperto da cauda, reflexo auricular e postura. Também apresentaram tremores e sinais de sedação e respiração forçada.

Quanto a dose de 50 mg/kg, nenhum animal foi a óbito e o comportamento dos animais que receberam esta dose foi semelhante aos controle negativo, contudo, os animais apresentaram leve sedação e respiração forçada nas primeiras 24 horas após administração oral. Com estes dados foi calculadoa uma Dose Letal 50% (DL50) equivalendo a 160 mg/kg.

Segundo Raza et al. (2002), além da alteração do peso corporal, o peso individual de cada órgão também pode ser considerado um indicador de efeitos adversos promovidos pela

droga, sendo esses dois parâmetros indicativos de toxicidade quando o animal perde mais que 10% do peso corpóreo inicial.

A tabela 8 mostra a evolução ponderal (alteração da massa corpórea) e o consumo de ração e água dos animais, respectivamente.

Tabela 8: efeito da administração oral da FAT-Ap na evolução ponderal (alteração da massa corpórea) e no consumo de água e ração em camundongos Swis durante 14 dias.

Parâmetro	Sexo	Salina	FAT 50 mg/kg	FAT 100 mg/kg
P. inicial (g)	M	28,83±1,32	27,67±2,58	30,67±0,81
P. final (g)		35,33±13,1	34,50±3,72	34,50±3,72
Ganho (%)		22,54	24,68 aaa / bbb	12,48 *** aaa / ccc
P. inicial (g)	F	27,50±0,83	25,00±1,41	25,33±3,14
P. final (g)		33,50±0,83	30,17±2,04	28,67±12,61
Ganho (%)		21,81	20,58 ddd / ccc	13,18 *** ddd / bbb
Consumo de ração/dia (g)	M	32,21±1,71	37,93±2,89 aa / bb	28,50±2,31 ** aa / cc
	F	37,00±3,25	36,07±2,86 dd / cc	29,07±2,81 ** dd / bb
Consumo de água/dia(mL)	M	52,14±1,31	52,86±1,25 a / b	56,43±2,25 * a / c
	F	44,43±1,23	50,00±0,90 d / c	56,43±3,93 * d / b

P. inicial=peso inicial; P. final=peso final; M=machos; F=fêmeas. Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=6). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, */+p<0,05; **/+p<0,01; ***/+++p<0,001. A ausência de asteriscos e/ou cruces demonstra que os dados não foram significativos. O símbolo * representa a comparação dos grupos da FAT-Ap com o grupo salina. As letras coloridas correlaciona a comparação dos grupos da FAT-Ap. entre si tanto para fêmeas quanto para machos. A cor das cruces correlaciona os grupos.

Os valores das médias obtidas para cada grupo na evolução ponderal dos animais mostraram diferença estatisticamente significativa para a dose de 100 mg/kg, tanto quando comparada com os grupos salina, quanto com os grupos que receberam a dose de 50 mg/kg da FAT-Ap. Esses resultados mostraram que, embora os animais na dose de 100 mg/kg

tenham ganhado peso, os valores no aumento de massa corpórea para os animais nessa dose foram inferiores aos dos grupos salina e FAT 50 mg/kg (tabela 7).

O mesmo aconteceu quando o consumo diário de ração dos animais foi analisado. Tanto o grupo FAT 100 mg/kg machos quanto fêmeas apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparados aos grupos salina e FAT 50 mg/kg, mostrando que, ao receber a dose de 100 mg/kg, os animais consumiram um valor menor de ração.

Ainda na tabela 8, pode-se observar que, houve diferença estatisticamente significativa quanto ao consumo diário de água ao comparar os grupos salina e FAT-Ap 50 mg/kg com a dose de 100 mg/kg, sendo que, para esta última os animais consumiram uma maior quantidade de água.

Quanto ao consumo de água e ração dos grupos na dose de 50 mg/kg, ao comparar os valores com os grupos salina, não houve diferença estatisticamente significativa. Isso mostra que provavelmente a toxicidade da FAT-Ap esteja relacionada com a dose administrada.

A tabela 9 mostra a média de peso relativo dos órgãos (baço, fígado, coração e rins) para cada grupo.

Tabela 9: Efeito da administração oral da FAT-Ap sobre o peso relativo dos órgãos ao final do experimento.

Peso relativo dos órgãos (g/100g)	Sexo	Salina	FAT 50 mg/kg	FAT 100 mg/kg
Fígado	M	4,26±2,18	4,72±0,60 ^{aa}	3,81±0,60 ^{*/aa}
Baço		0,59±0,32	0,73±0,47	0,80±0,21
Coração		0,47±0,02	0,50±0,05	0,52±0,11
Rins		1,23±0,64	1,37±0,11	1,24±0,16
Fígado	F	4,65±0,46	4,45±0,18 ^{aa}	3,53±1,74 ^{*/aa}
Baço		0,59±0,11	0,45±0,11	0,48±0,25
Coração		0,48±0,03	0,45±0,04	0,36±0,18
Rins		1,08±0,11	0,97±0,08	0,85±0,44

M=machos; F=fêmeas. Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=6). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, ^{*}/+p<0,05; ^{**}/++p<0,01; ^{***}/+++p<0,001. A ausência de asteriscos e/ou cruces demonstra que os dados não foram significativos. O símbolo * representa a comparação dos grupos da FAT-Ap com o grupo salina. O símbolo a representa a comparação dos grupos da FAT-Ap. entre si tanto para fêmeas quanto para machos.

Como pode ser observado, houve diferença significativa quanto ao peso relativo do fígado nos grupos machos e fêmeas que receberam a dose de 100 mg/kg.

De acordo com Souza (2011), alcaloides pirrolizidínicos possuem alto potencial hepatotóxico, produzindo principalmente síndrome de obstrução sinusoidal (doença veno-oclusiva). Em altas doses induz à doença hepática aguda, inclusive fulminante. Em exposição prolongada desencadeia hepatites crônicas e cirrose, e em quadros agudos pode haver dor abdominal e ascite. Porém, não há estudos que comprovem a presença desse grupo de alcaloides em plantas pertencentes à família Apocynaceae, bem como estudos que relatem sobre o potencial hepatotóxico de alcaloides indólicos (principal classe existente em plantas dessa família), e apesar dos parâmetros evolução ponderal e peso relativo dos órgãos serem importantes no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica, não é possível atribuir toxicidade a um determinado extrato apenas baseando-se nesses critérios (MESSIADES, 2014; IVERSEN et al., 2003).

Quanto às características macroscópicas dos órgãos não foi observada nenhuma alteração quanto à coloração ou forma.

Em estudo já citado, feito por MessiaDES (2014), onde foi realizado teste de toxicidade aguda utilizando extrato etanólico bruto das cascas de *A. pyrifolium* em ratos *Wistar*, com doses de 50, 150, 250 e 1000 mg/kg, ao final do experimento, os órgãos também foram observados macroscopicamente. Também não foi detectada nenhuma modificação na coloração ou forma. Neste estudo houve óbito de 1 animal (macho) correspondente a dose de 250 mg/kg e de 2 animais (fêmeas) correspondentes a dose de 1000 mg/kg.

Ainda sobre o estudo feito por MessiaDES (2014), os efeitos de sedação, analgesia caudal, redução da atividade geral e redução da resposta ao toque foram mais intensos nos animais que receberam as doses de 250 e 1000 mg/kg, além disso, tais efeitos foram mais evidentes nas fêmeas, fato que também foi observado neste estudo. Contudo, podemos dizer que o número maior de óbitos neste estudo pode ter ocorrido devido ao uso de uma fração bem mais concentrada de alcaloides, potencializando assim os efeitos tóxicos.

Também foi observado que, para a FAT-Ap utilizada neste estudo, os efeitos toxicológicos foram dose-dependente e que a partir desse teste foi possível estabelecer doses para os ensaios de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Deste modo, as doses escolhidas para estudo farmacológico da FAT-Ap foram de 10, 20 e 30 mg/kg, visto que, apesar da não ocorrência de óbito para a dose de 50 mg/kg, alguns efeitos tóxicos comportamentais foram observados, necessitando com isso, selecionar doses menores

3.2. Ensaio farmacológicos

3.2.1. Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio dos testes de edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida também por carragenina. As doses escolhidas para o presente trabalho foram menores que as de alguns estudos que serão citados no decorrer da discussão, visto que, a fração teste utilizada aqui apresenta-se mais concentrada devido a “marcha” realizada para isolar os alcaloides presentes no extrato bruto.

O edema, uma característica fundamental da inflamação aguda, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de fluido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício, resultado das ações de mediadores como HIS (histamina), bradicinina (BK), LT (leucotrieno), componentes do complemento, substância P (SP) e fator ativador de plaquetas (PAF). Estes fatores alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas (CASTARDO, 2007).

A carragenina desencadeia o processo inflamatório através de mediadores pré-formados como histamina e prostaglandinas. As prostaglandinas, em especial PGE₂α e PGF₂α, apresentam pico máximo entre 2 a 3 horas após a aplicação da substância (VAJJA et al., 2004). O edema de pata provocado por carragenina é uma metodologia que permite a observação do efeito sistêmico da substância teste através da indução de um estímulo inflamatório local (CASTARDO, 2007).

De acordo com Di Rosa (1971), o edema provocado pela carragenina ocorre em três fases: na primeira hora após a injeção de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é mediado por histamina e serotonina; na segunda hora, é mediado por cininas, e a fase de maior intensidade do edema ocorre três horas após a injeção de carragenina e caracteriza a ação de prostaglandinas sobre a permeabilidade capilar.

A inibição do edema causado por carragenina em muitos estudos é avaliada por anti-inflamatórios não-esteroidais, a exemplo deste, em que o fármaco indometacina foi utilizado como controle positivo. A tabela 10 mostra o percentual de inibição das doses da FAT-Ap. utilizadas para teste em comparação com o grupo veículo e com o controle positivo.

Tabela 10 – Efeito anti-inflamatório da FAT-Ap. sobre a espessura da pata (milímetros) até a quarta hora após a indução da inflamação por carragenina 1%.

Tratamentos	1 hora	Inibição (%)	2 horas	Inibição (%)	3 horas	Inibição (%)	4 horas	Inibição (%)
(Salina)	0,93±0,04	--	1,23±0,04	--	1,43±0,15	--	1,49±0,13	--
(Indometacina)	0,79±0,02 ***	15,0	0,99±0,01 **	19,5	0,93±0,05 ***	35,0	0,79±0,07 ***	47,0
(FAT 10 mg/kg)	0,90±0,06 aaa	3,2	1,07±0,10	13,0	1,26±0,05 bb cc	11,9	1,35±0,09 ddd e	8,1
(FAT 20 mg/kg)	0,83±0,03 *	10,7	0,98±0,08 **	20,3	1,08±0,03 *** cc	24,5	1,16±0,06 *** e f	22,1
(FAT 30 mg/kg)	0,76±0,04 *** aaa	18,3	1,00±0,01 **	18,7	0,95±0,09 *** bb	33,6	0,94±0,03 *** ddd f	37,0

Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=6). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, */+p<0,05; **/+ +p<0,01; ***/+ + +p<0,001. A ausência de asteriscos e/ou cruzes demonstra que os dados não foram significativos. Os asteriscos representam as comparações feitas em relação ao controle negativo. As cruzes representam as comparações feitas entre as doses da FAT-Ap. As cores das letras correlacionam os grupos.

Com base na tabela 10, observou-se efeito antiedematogênico tanto no grupo controle positivo (indometacina) quanto nos grupos que foram tratados com a FAT-Ap nas doses de 20 e 30 mg/kg, já após a primeira hora. Após a quarta hora, os resultados também mostraram que a espessura da pata diminuiu significativamente para as doses de 20 e 30 mg/kg, quando comparados ao grupo controle negativo (salina), que por sua vez, apresentou aumento da espessura da pata até a quarta hora.

Além disso, pode-se observar que o efeito antiedematogênico pode estar relacionado com a dose da FAT-Ap., onde a maior dose empregada (30 mg/kg), apresentou um melhor percentual de inibição do edema (37,0%) que as demais, quando comparadas ao controle positivo (47,0%).

Os dados também mostraram que após a quarta hora de indução da inflamação, houve diferença estatisticamente significativa entre as doses da FAT-Ap, pois a dose de 10 mg/kg não provocou inibição do edema quando comparada com as doses de 20 e 30 mg/kg. Isso pode servir como base para assegurar que a inibição do edema pode estar associada à concentração da FAT-Ap administrada.

Outro fato que pode ser levado em consideração é que o aumento da atividade anti-inflamatória ocorreu com o decorrer do tempo.

De acordo com Lima et al. (2013), esse comportamento pode ser chamado de efeito tardio, podendo existir duas fases: a primeira, ocorrendo em torno de uma hora (fase rápida), em que ocorre liberação de histamina, serotonina e bradicinina, e uma segunda fase, que ocorre entre uma e seis horas após indução da inflamação, onde cininas e prostaglandinas são liberadas, ativando a cascata da cicloxigenase 2 (COX-2).

Deste modo, é provável que o perfil anti-inflamatório da FAT-Ap. esteja relacionado com ativação dessa cascata, inibindo a liberação desses mediadores e consequentemente os eventos vasculares da inflamação, que culminam na dilatação das pequenas arteríolas e o extravasamento de proteínas para o tecido e consequentemente a formação de edema.

A figura 73 mostra mais claramente o perfil de inibição do edema para cada grupo, usando como parâmetro o aumento da espessura da pata em função do tempo.

Figura 73 - Avaliação do efeito anti-inflamatório da FAT-Ap em função do tempo decorrido após indução de edema por carragenina 1%.

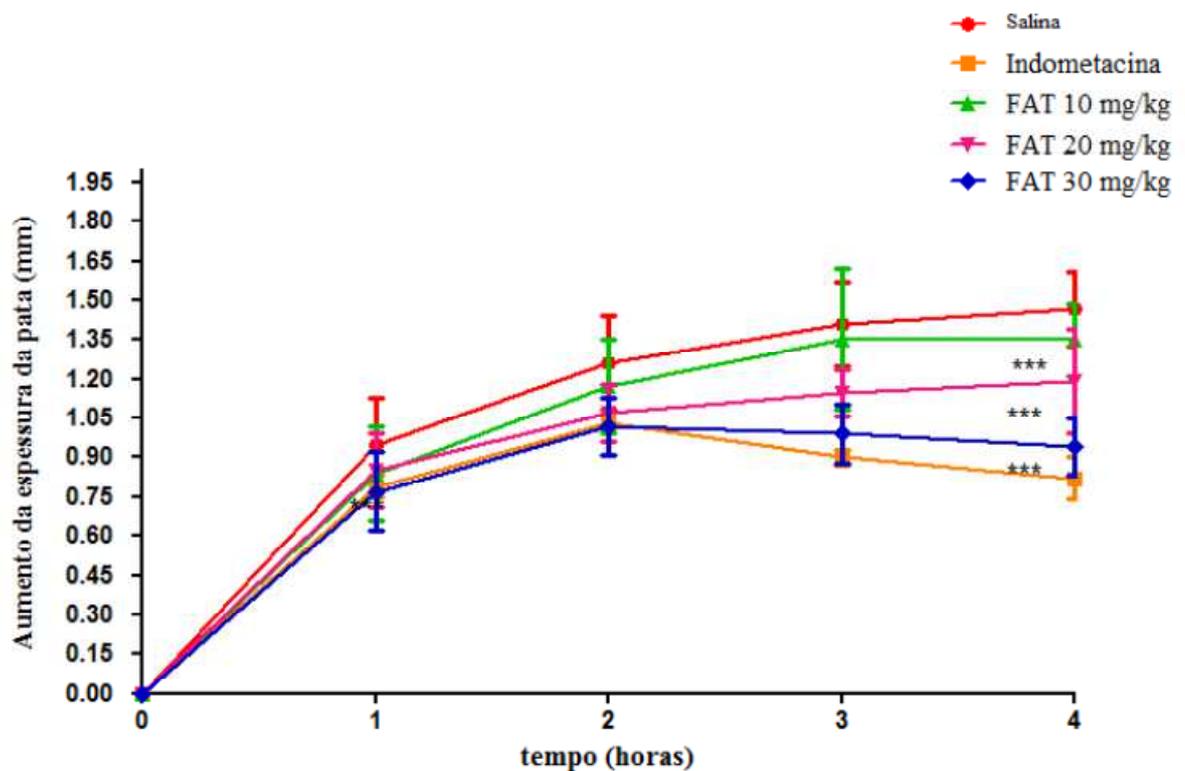


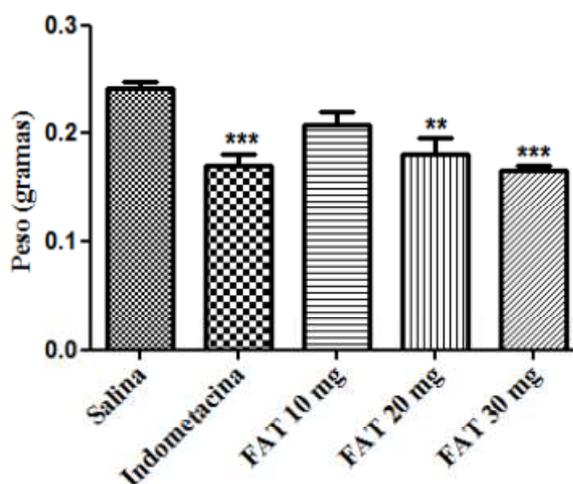
Gráfico de linhas. Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A ausência de asteriscos mostra que os dados não foram significativos.

Em estudo realizado por Nogueira et al. (2014), a fração aquosa das sementes da mesma espécie foi testada na dose de 50 mg/kg e apresentou redução do edema da pata após a terceira ($p<0,01$) e quarta ($p<0,001$) hora de indução da inflamação.

MESSIADES (2014), em ensaio de edema de pata também em camundongos *Swiss*, testou o extrato etanólico bruto das cascas do caule de *A. pyrifolium* nas doses 62,5, 125 e 250 mg/kg. Os resultados mostraram atividade anti-inflamatória significativa após a segunda ($p<0,05$; $p<0,01$) e quarta hora ($p<0,001$) de inibição da inflamação para as três doses.

A figura 74 mostra a diferença entre as medias de peso das patas direitas de cada grupo (pata que recebeu o agente flogístico). A diferença entre os pesos foi estatisticamente significativa (FAT 20 mg/kg : $p<0,01$; Indometacina e FAT 30 mg: $p<0,001$) quando comparados ao controle negativo. Esse procedimento foi importante para verificar a atividade antiedematogênica apresentada pela FAT nas doses de 20 e 30 mg/kg, já que o peso da pata ao final do experimento está diretamente relacionado com a extensão do edema durante o processo inflamatório (CELEDONIO, 2008)

Figura 74: Comparação entre os pesos das patas direitas (que receberam carragenina 1%) ao final do experimento.



Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, * $p<0,05$; ** $p<0,01$; *** $p<0,001$.

A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

O teste de peritonite avalia a migração leucocitária, por meio da contagem de leucócitos ($\times 10^3 /\text{mm}^3$) presentes no exsudato liberado na cavidade peritoneal, após a

administração de carragenina, 4 horas antes da contagem das células (CASTARDO, 2007) (Figura 75).



Figura 75: Injeção intraperitoneal de carragenina em camundongos (Fonte: OLINDA, 2010).

A tabela 11 mostra os resultados do ensaio de peritonite induzida por carragenina 1%. Foi possível observar uma menor quantidade de polimorfonucleares no exsudato coletado tanto no grupo que recebeu indometacina ($p < 0,01$) quanto para o grupo que recebeu a FAT-Ap na dose de 30 mg/kg ($p < 0,01$), demonstrando assim, que a espécie possui substâncias que impedem a migração leucocitária ou apenas atuem inibindo os mediadores químicos responsáveis pelo processo edematogênico, confirmando com isso, a atividade observada no teste de edema de pata (CASTARDO, 2007).

Tabela 11- Efeito antiquimiotático da FAT-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos após peritonite induzida por carragenina 1%.

Tratamentos	Número global de polimorfonucleares ($\times 10^3 / \text{mm}^3$)	Inibição (%)
Salina	14,58 \pm 0,67	--
Indometacina	8,03 \pm 1,35 ^{***}	45,0
FAT-Ap 20 mg/kg	12,09 \pm 2,27 ^{ns}	17,1
FAT-Ap 30 mg/kg	8,77 \pm 1,15 ^{***}	39,8

Os resultados estão expressos como média \pm d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

Em estudo realizado por Aquino (2010), no qual o EEB e várias frações (Hex:CHCl₃ 50%; CHCl₃ 100%; CHCl:AcOEt 50%; AcOEt 100%; CHCl₃:MeOH 5% e CHCl₃:MeOH 10%) das cascas do caule de *Aspidosperma tomentosum*, tanto o EEB quanto as frações (com exceção da fração AcOEt 100%) apresentaram atividade anti-quimiotática significativa, praticamente abolindo o influxo de células polimorfonucleares para o tecido frente a peritonite induzida por tioglicolato 3%.

Do mesmo modo, em pesquisa realizada por Rodrigues (2015), soluções orais feitas a partir do EEB das cascas do caule de *A. pyriformium*, nas concentrações 125 e 250 mg/kg reduziram o número de leucócitos em 71,40 e 93,53%, respectivamente, em peritonite induzida por carragenina 1%.

3.2.2- Atividade Antinociceptiva

Os ensaios para avaliação da atividade antinociceptiva apresentaram melhor resposta farmacológica do que os realizados para avaliar atividade anti-inflamatória.

O teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético é capaz de produzir contração da musculatura abdominal, juntamente com a extensão de pelo menos uma das patas posteriores. Embora seja um modelo simples e pouco específico, o teste de contorções abdominais é muito sensível e permite avaliar a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (OLINDA, 2010).

A tabela 12 mostra que todas as doses da FAT-Ap apresentaram percentual de inibição significativo com valores aproximados aos do grupo controle positivo (dipirona 500 mg/kg).

Tabela 12- Efeito antinociceptivo da FAT-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Tratamentos	Número de contorções durante 20 minutos	Inibição (%)
Salina	40±13,02	--
Dipirona	1,33±1,75***	96,67***
FAT 10 mg/kg	9,33±9,0***	76,67***
FAT 20 mg/kg	9,83±7,1***	75,42***
FAT 30 mg/kg	6,33±7,1***	84,17***

Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

Essa mesma atividade foi testada em estudo realizado por Nogueira (2014), no qual doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato aquoso das sementes de *A. pyriformium*, mostraram atividade antinociceptiva significativa quando relacionadas com os grupos controle positivos (morfina 5 mg/kg e indometacina 10mg/kg).

Rodrigues (2015), realizou esse mesmo teste usando soluções orais nas doses de 125 e 250 mg/kg a partir das cascas do caule de *A. pyriformium* e constatou que a dose de 250 mg/kg inibiu de forma mais significativa (89,4%) o número de contorções quando comparada com o controle positivo (dipirona 500 mg/kg) (77,65). Foi relatado no mesmo estudo que tal efeito pode estar relacionado com receptores TRPV1 (canais de cálcio não seletivos, presentes em tecidos envolvidos na resposta da dor e inflamação), e que substâncias que são antagonistas desses receptores podem provocar atividade antinociceptiva em camundongos.

O teste da injeção subplantar de formalina, um modelo mais específico que o teste de contorções abdominais, permitiu avaliar dois tipos de dor: uma de origem neurogênica, como resultado da estimulação direta dos neurônios nociceptivos, observada nos primeiros 5 minutos após a administração da formalina, e outra de origem inflamatória, caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios, observada entre 15 a 30 minutos após a injeção da formalina. A resposta tônica à dor foi avaliada a partir do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata que recebeu o agente flogístico, tanto na fase I quanto na fase II (OLINDA, 2010) (figura 76).



Figura 76: Teste de formalina em camundongos (Fonte: OLINDA, 2010).

Tanto o grupo que recebeu a indometacina quanto o grupo que recebeu a FAT-Ap 30 mg/kg, apresentaram um percentual de inibição maior que 50%, cessando as lambeduras em menor tempo ao final da fase I (neurogênica). Já na fase II (inflamatória) do experimento,

tanto a indometacina quanto todas as doses da FAT-Ap diminuíram significativamente o tempo de lambeduras quando comparados com o grupo controle negativo, sendo a dose de 30 mg da FAT-Ap a mais efetiva (85,57% de inibição) (tabela 13).

Tabela 13 – Efeito antinociceptivo da FAT-Ap nas fases I (0-5 minutos) e II (15-30 minutos) após nocicepção induzida por formalina 1%.

Tratamentos	Fase I (0-5 minutos) Tempo que o animal passou lambendo a pata	Inibição (%)	Fase II (15-30 minutos) Tempo que o animal passou lambendo a pata	Inibição (%)
Salina	4,53±0,34	--	11,30±1,66	--
Indometacina	1,58±1,39**	62,12**	1,00±1,43***	91,15***
FAT 10 mg/kg	3,14±1,09 a b	30,68 ^{ns}	6,90±1,5**	38,93** aa bbb
FAT 20 mg/kg	2,98±1,00 ^{ns} a c	34,21 ^{ns}	3,4±2,0***	69,91*** aa cc
FAT 30 mg/kg	1,90±1,09** b c	58,05**	1,63±1,79***	85,57*** bbb cc

Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=6). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, */+p<0,05; **/+ +p<0,01; ***/+ + +p<0,001. A ausência de asteriscos e/ou cruzes demonstra que os dados não foram significativos. Os asteriscos representam as comparações feitas em relação ao controle negativo. As cruzes representam as comparações feitas entre as doses da FAT-Ap. As cores das cruzes correlacionam os grupos.

Messiades (2014), testou doses de 62,5, 125 e 250 mg/kg do extrato etanólico bruto das cascas do caule de *A. pyrifolium*, mostrando que ao final do experimento, a dose de 125 mg/kg apresentou percentual de inibição significativo (p<0.001) frente ao número de lambeduras tanto na fase precoce (64,51%) quanto na fase tardia (97,22%) do experimento.

Esses resultados sugerem que a FAT-Ap apresenta possível efeito central e periférico frente ao estímulo da dor e inflamação, o que foi observado também por Nogueira et al. (2014), em que para o mesmo teste, a dose de 100 mg/kg do extrato aquoso das sementes de *A. pyrifolium* também apresentou diminuição no tempo de lambeduras na fase tardia de modo semelhante aos controles positivos (morfina 5 mg/kg e indometacina 10 mg/kg).

Como já demonstrado no teste de edema de pata, os percentuais de inibição podem estar diretamente relacionados com o aumento da dose da FAT-Ap. Tal potencial anti-inflamatório e analgésico se deve provavelmente à ação de numerosos alcaloides indólicos

encontrados em espécies do gênero *Aspidosperma*, levando em consideração o teste qualitativo para presença de alcaloides, que por sua vez apresentou uma reação de precipitação fortemente positiva durante o estudo fitoquímico. Os resultados relacionados à diminuição do número de lambeduras na fase II deste teste podem contribuir positivamente para o perfil anti-inflamatório observado na diminuição do edema de pata causado por carragenina, de modo que, após o tempo de trinta minutos, tanto o controle positivo quanto a FAT-Ap podem ter provocado a inibição de mediadores responsáveis por aumentar a permeabilidade vascular, reduzindo o edema provocado pelo agente inflamatório.

4. CONCLUSÃO

Os resultados descritos neste estudo demonstraram que a espécie *A. pyrifolium* Mart. apresentou potencial tanto anti-inflamatório quanto analgésico frente aos modelos animais. Deste modo, tal espécie mostrou-se fonte promissora de substâncias com atividade farmacológica. Todavia, ressalva-se o cuidado para o potencial toxicológico apresentado, sendo assim seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

REFERÊNCIAS:

- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. S. T.; QUINTANS-JÚNIOR, I. J.; POLARI, R. N.; BAROBOSA-FILHO, J. M.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- AQUINO, A. B. Avaliação do perfil anti-inflamatório e antinociceptivo da casca do caule de *Aspidosperma tomentosum*. **Dissertação de Mestrado**, UFA, Marceió, 2010.
- CARVALHO, G. D; ARRUDA, V. M. **Caderno sobre plantas tóxicas: principais plantas tóxicas causadoras de morte súbita em bovinos**. 1ª ed. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa; 2011.
- CASTARDO, J. C. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico bruto da *Garcinia gardneriana* (Planchon & Triana) Zappi em modelos experimentais de inflamação aguda em camundongos. **Dissertação de Mestrado** em Farmacologia da Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.
- CASTRO, K. N. C.; CARVALHO, A. L. O.; ALMEIDA, A. P.; OLIVEIRA, D. B. , BORBA, H. R.; COSTA, S. S. Preliminary in vitro studies on the *Marsipianthes chamaedrys* (bóia-caá) extracts at fibrinoclotting induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 41, p. 929-932, 2003.
- CELEDONIO, N. R. Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e antiedematogênico do óleo essencial de *Croton argyrophylloides* e seus constituintes: alfa-pineno e trans-cariofileno. **Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas da Universidade Estadual do Ceará**, 2008.
- CORTES, M. L.; CASTRO, M. M. C.; JESUS, R. P.; NETO, J. A. B. KRAYCHETE, D. C. Uso de terapêutica com ácidos graxos ômega-3 em pacientes com dor crônica e sintomas ansiosos e depressivos. **Revista Dor**, v. 14, n. 1, p. 48-51, 2013.
- CUNHA, F.Q. et al. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology** , v. 70, p. 1-8, 1989.
- CUNHA, L. C.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E.; MELO, D. S.; PARENTE, L. L.; SILVA, M. A. C.; CONCEIÇÃO, E. D.; GONZAGA, L. Q. S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tiboubou* Aul (Titiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 34, n. 3, p. 357-352, 2013.
- DE ASSIS, C. M.; MORENO, P. R. H.; YOUNG, M. C. M.; CAMPOS, I. P. A.; SUFFREDINI, I. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcaloides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia** , v. 19, n. 2B, p. 626-631, Abr./Jun, 2009.

- DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D.A.; GIROUD, J.P. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, n.1, p.15-29, 1971.
- FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and anhibition of arachidonic acid metabolismo by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, p. 283-288, 1991.
- FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, V. 16, P. 6-8, 2004.
- FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Rev. Infarma**, v. 16, p. 7-8, 2004.
- GRIS, P.; GAUTHEIR, J.; CHENG, P.; GIBSON, D. G.; GRIS, D.; LAUR, D;PERSON, J.;WENTUORTH, S.; NACKLEY, A. G.; MAWNER, W.; DIATCHENKO, L; A novel alternatvely spliced isoform of the mu-opioid receptor functional antagonism. **Molecular Pain**, v. 6, p. 1-10, 2010.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin teste in mice: dissociation between inflammatory an non-inflammatory pain. **Revista Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.
- IVERSEN, P. O.; NOCOLAYSEN, G. Water-for life. Tidsskrift for den Norske Laegeforening, v. 123, p.3402-3405, 2003.
- KLAUMAN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p. 1-12, 2008.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; EJ, D. B. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc**, v. 18, p. 412, 1959.
- KUMER, C. L.;COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios não esteroidais inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2). Aspectos gerais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 5, n. 4, p. 498-512, 2002.
- LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearenses* (A. C. Smith) (*Imburana-de-cheiro*). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 13, n. 3, p. 415-422, 2013.
- LIMA, M. C. J. S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyrifolium* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, c. 55, n. 1, p. 320-324, 2010.
- LINS, F. S. V. Levantamento Etnobotânico das espécies vegetais cultivadas e utilizadas com fins medicinais no município de Cuité, Paraíba. **[Monografia]**, p. 16, Cuité- Paraíba, 2013.
- LOPES, S. G. **Fundamento da Toxicologia Clínica**. São Paulo: Editora Atheneu, 2006.
- MESSIADES, D. M. S. Estudo das propriedades biológicas, fitoquímicas e toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Dissertação de Mestrado** arentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Campina Grande, 2014.

MONTENEGRO, C. A. Atividade gastroprotetora de *Xylopialangsdorffiana* A. St.-Hil & Tul (Annonaceae) em modelos animais. **Dissertação de mestrado**- Programa de Pós-Graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba (UFPB), João pessoa, 2011.

NÓBREGA, M. G. L. O Estudo Fitoquímico e Farmacológico da *Aspidosperma pyrifolium* Mart.:“Ensaio pré-Clínicos.” **Dissertação de Mestrado** apresentado ao Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Recife-PE, 2008.

NOGUEIRA, P. C. N.; ARAÚJO, R. M.; VIANA, G. S. B.; ARAÚJO, D. P.; BRAZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R. Plumeran Alkaloids and Glycosides from the Seeds of *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Journal Braz. Chem. Soc.**, v. 25, n. 11, p. 2108-2120, 2014.

OLINDA, A. C. C. Estudo da atividade antinociceptiva de um novo fator extraído do veneno de *Crotalus durissus collilineatus*. **Dissertação de Mestrado**. UFC, 2010.

RAZA, M. M.; AL-SHABANAH, O. A.; EL-HADIYAH, T. M.; AL-MAJED, A. A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swiss albino mice. **Journal of Scientia Pharmaceutica**, v. 70, p. 135-145, 2002.

RIET-CORREA, F.; BEZERRA C. W. C. MEDEIROS, R. M. T. **Plantas tóxicas do Nordeste**. Sociedade Vicente Pallotti Editora, Universidade Federal de Campina Grande. 2011.

RODRIGUES, J. V. M. Desenvolvimento de uma solução oral com atividade farmacológica a partir de extrato de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. **Dissertação de Mestrado** – UEPB, Campina Grande-PB, 2015.

SANTOS, D. S. Avaliação do efeito anti-inflamatório do toque terapêutico no modelo experimental de edema de pata induzido por adjuvante completo de Freund em camundongos. **Tese de doutorado em Enfermagem**, Escola de enfermagem da Universidade Federal de Ribeirão Preto, São Paulo, 2011.

SILVA, D. M.; RIET-CORREA, F; MEDEIROS, R. M. T.; OLIVEIRA, O. F. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Revista de Pesquisa Veterinária Brasileira**., v. 26, n. 4, p. 223-236, 2006.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Physicalexercise anflammatory process adaptative condicion: na overview. **Revista Brasileira de Cineantropometria and Desempenho Humano**, v. 12, n. 4, p. 320-328, 2011.

SOUZA, A. F. M. Hepatotxicidade por chás. **Revista Suplemento Hepatotxicidade**, v. 4, n. 48, p. 23, fev, 2011.

TRACEY, I.; MANTYH, P. W. The cerebral signature of pain perception and Its modulation. **Neuron**, v. 55, p. 377-391, 2007.

VAJJA, B. N. L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R.; JOSHI, V. D. Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents. **International Immunopharmacology**, v. 4, p. 901 – 909, 2004.

VIEIRA, A. C. S. Avaliação da atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de *Punica granatum* L. (romã). **Dissertação de Mestrado** apresentada a Pós-graduação em Enfermagem. Universidade Federal de Alagoas, p. 19, 2014.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 16, p 109-111, 1983.

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

ANEXO 1

PARECER
NÚMERO DO PROJETO/ PROTOCOLO : 5402042015
CIAEP/CONCEA Nº: 01.001.2012
DATA DO PARECER: 11/06/2015

1. Pesquisador Responsável: **Harley da Silva Alves**
Título do Projeto: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DE ASPIDOSPERMA PYRIFOLIUM MART.
2. Considerações: Este projeto envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794 de 08 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, Após esclarecimento sobre pendências anteriores, este foi **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do CESED, em reunião de 11 / 06 / 2015

Vigência do Projeto	Janeiro de 2015 à março de 2016
Espécie / linhagem	Camundongo e ratos
Nº de animais	100 camundongos e 24 ratos
Peso / idade	150-220g (ratos) / 25-35 g (camundongos)
Sexo	Masculino e feminino
Origem	

3. Parecer Final: **APROVADO**

Thárcia Kiara B. de Oliveira
Coordenadora do CEUA-CESED

Av. Senador Argemiro de Figueiredo, 1901 - Tanic
 CEP 58411-020 | Campina Grande - PB | (83) 2101.8800
 www.osed.br | facisa@osed.br | fcm@osed.br | esac@osed.br
 CEP: 07 166 001/0001-00