

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA

Estudo Biomonitorado para Avaliação da Atividade Antiinflamatória
e Analgésica das Folhas da Espécie *Protium spruceanum* (Benth)
Engler. (Burseraceae)

IVANILDES VASCONCELOS RODRIGUES

OURO PRETO – MG

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
ESCOLA DE FARMÁCIA

Estudo Biomonitorado para Avaliação da Atividade Antiinflamatória
e Analgésica das Folhas da Espécie *Protium spruceanum* (Benth)
Engler. (Burseraceae)

Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, linha de pesquisa: Química e Farmacologia de Substâncias Bioativas.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Ouro Preto

2010

R696e

Rodrigues, Ivanildes Vasconcelos.

Estudo biomonitorado para avaliação das atividades antiinflamatória e analgésica da folhas da espécie *Protium spruceanum* (Benth) Engler. (Burseraceae) [manuscrito] / Ivanildes Vasconcelos Rodrigues. – 2010.

xxi, 121 f.: il. color., tabs., grafs.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza.

Co-orientadora: Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Escola de Farmácia. Programa de Pós graduação em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos

1. Antiinflamatórios - Teses. 2. Analgésicos - Teses. 3. Plantas medicinais - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 633.88

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Autora: Ivanildes Vasconcelos Rodrigues

Título: “Estudo Biomonitorado para Avaliação da Atividade Antiinflamatória e Analgésica das Folhas da Espécie *Protium spruceanum* (Benth) Engler. (Burseraceae)”

Banca Examinadora

Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza

Orientador – Escola de Farmácia/UFOP

Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP/USP

Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho

Escola de Farmácia/UFOP

ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 31ª DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DA ESCOLA DE
FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO

1 Aos vinte e cinco dias do mês de outubro de dois mil e dez, segunda-feira, realizou-se,
2 a partir das nove horas e trinta minutos, na sala cento e quatro do Bloco de Salas –
3 Campus, a sessão de defesa de dissertação da candidata ao grau de Mestre em Ciências
4 Farmacêuticas, **IVANILDES VASCONCELOS RODRIGUES** intitulada “Estudo
5 Biomonitorado para Avaliação da Atividade Antiinflamatória e Analgésica das Folhas
6 da Espécie *Protium spruceanum* (Benth) Engler. (Burseraceae)”. A Banca
7 Examinadora constituiu-se dos Professores Doutores: Sidney Augusto Vieira Filho
8 (Departamento de Farmácia/UFOP), Norberto Peporine Lopes (Faculdade de Ciências
9 Farmacêuticas - USP) e Gustavo Henrique Bianco de Souza (Departamento de
10 Farmácia – UFOP) orientador. De acordo com o regulamento do Curso, o orientador,
11 Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, presidente da banca, abriu a sessão,
12 passando a palavra à candidata, que fez a exposição do seu trabalho. Em seguida, foi
13 realizada a arguição pelos examinadores na ordem registrada acima, com a respectiva
14 defesa da candidata. Finda a arguição, a Banca Examinadora se reuniu, sem a presença
15 da candidata e do público, tendo deliberado pela sua
16 aprovação. Nada mais havendo para constar, lavrou-
17 se a presente ata por mim, Mirela Pena Fagundes, secretária do CiPharma, e fez-se a
18 leitura pública da presente ata que segue assinada pelos membros da Banca
19 Examinadora e pela Coordenadora do Curso. Ouro Preto, 25 de outubro de 2010.

20
21
22 Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho
23 DEFAR/UFOP

24
25
26 Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes
27 Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP

28
29
30
31 Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza
32 DEFAR/UFOP

33
34
35 Prof.^a Dr.^a Vanessa Carla Furtado Mosqueira
36 Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

O presente trabalho foi realizado sob orientação do Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza no Laboratório de Farmacognosia do CiPharma e co-orientação da Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães no Centro de Ciência Animal da UFOP

Apoio Financeiro:
FAPEMIG

A Deus;

Aos meus pais José Pinto Brandão (sempre presente) e Maria Iris de Vasconcelos Brandão;

Ao meu orientador, amigo e padrinho Gustavo Henrique Bianco de Souza;

Ao meu marido, amigo e companheiro de todas as horas Antônio José da Cunha Rodrigues;

Dedico.

“Science can be mastered from books only at the most elementary level. For the journey to the frontiers of knowledge, an experienced and willing master needed as a guide”

Ernest Borek

1912-1986

“A ciência pode ser ensinada pelos livros apenas no seu nível elementar. Para se alcançar as fronteiras do conhecimento, um experiente e dedicado mestre é necessário como guia”

AGRADECIMENTOS

“Não há no mundo exagero mais belo que a gratidão.”

Jean de La Bruyère

Primeiramente a Deus, meu Senhor e Rei. A Ele toda honra, toda glória, todo louvor e todo meu trabalho, diariamente, eternamente. Pelo dom da vida, maior dom que existe e pela inteligência. Confiar n’Ele fez com que sempre tivesse a certeza de que seria possível e de que não seria em vão.

Ao orientador deste trabalho, amigo e padrinho Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza, pela confiança depositada em meu trabalho e em minha capacidade de pesquisadora; por todos os ensinamentos durante o tempo da pesquisa; pela amizade conquistada; pela dedicação e pela orientação dada em todos os momentos. Por ter me ensinado um novo olhar na área de produtos naturais, de olhos mais experientes, mais cuidadosos e mais amorosos. Guhbs, serei eternamente grata a você por tudo que me ensinou. O meu muito obrigado é insuficiente!

Ao amigo e colaborador deste projeto, Prof. Dr. Sidney Augusto Vieira Filho, carinhosamente Bibó, pela amizade, pelos ensinamentos, pelas conversas, pelos conselhos, pelas caronas, pela colaboração na identificação dos triterpenos isolados. A sua presença tornou a convivência no Laboratório de Farmacognosia ainda mais agradável. Você é realmente especial!

A pesquisadora Prof. Dra. Vivette Appolinário Rodrigues Cabral, pela coleta do material e pela identificação botânica, que foram de suma importância para a realização deste trabalho.

A todos os alunos de iniciação científica e amigos que passaram pelo Laboratório de Farmacognosia: Lucas Appolinário Chibli, Lívio Guimarães Pompeu, Juliana Pereira Lage da Silveira, Fabiana Fioravante Coelho, Juliana Neves de Paula Souza, Ana Claudia Gonçalves Silva, Tatiane Roquette, Janaina Brandão Seibert, Nathalia Lucca Silva, Jorge Lanna, Michelle Carvalho Neves, Patricia Fernanda Monteiro, pela convivência agradável, pelas conversas, pelas gargalhadas inúmeras, pelos trabalhos realizados juntos, pelos ensinamentos. Vocês todos também são responsáveis pelos frutos que estão sendo colhidos agora.

Agradeço especialmente a Fabiana Fioravante Coelho (Bi) que muito me ajudou no início deste trabalho. Pela ajuda nas faxinas do laboratório, pela ajuda nos primeiros ensaios biológicos, pela companhia nas viagens aos congressos. Bi, gosto de você de graça, você sabe! Foi muito bom trabalhar com você durante todo este tempo! Obrigada mesmo!

Especialmente agradeço também a Juliana Neves de Paula Souza (Juju) que muito me ajudou na realização dos ensaios químicos e biológicos. Agradeço imensamente por você abrir mão várias vezes de seus finais de semana para me ajudar nos ensaios, pela acolhida

em sua casa após minha mudança para Belo Horizonte, pelas conversas até fora de hora, pela amizade, pela dedicação... Poucas pessoas conheci em minha vida com a sua dedicação, com a sua responsabilidade e com a sua vontade de aprender tudo e sempre! Sem sua ajuda não teria sido possível terminar esse trabalho! Serei eternamente grata por tudo!

À Profa. Dra. Andrea Grabe Guimarães, co-orientadora deste trabalho, que muito colaborou com a realização dos ensaios biológicos disponibilizando o espaço, os equipamentos e os padrões de fármacos para que as atividades biológicas fossem avaliadas. Agradeço também a colaboração nas análises dos resultados dos ensaios biológicos e na análise estatística dos dados. Suas sugestões fizeram nosso trabalho ficar ainda melhor. Muito obrigada mesmo!

Ao colaborador deste projeto Prof. Dr. Orlando David Henrique dos Santos, que muito nos ajudou na realização do teste de propriedade antioxidante, permitindo que usássemos seus materiais para conclusão dos trabalhos. Agradeço também pelo carinho e pelo bom humor sempre.

Ao Prof. Dr. Fábio Ferreira Perazzo pela amizade e pelas orientações sobre o método de formalina.

À Profa. Dra. Vanessa Carla Furtado Mosqueira, por ter disponibilizado o Laboratório de Tecnologia Farmacêutica e Nanobiotecnologia para a utilização do espectrofotômetro de UV-VIS.

Aos funcionários da Escola de Farmácia e aos técnicos dos Laboratórios de Pesquisa e Ensino da Escola de Farmácia, em especial aos funcionários que passaram pela secretaria do CiPharma, que sempre estiveram dispostos a ajudar quando preciso e aos técnicos Adão Júlio da Conceição pelo apoio sempre que necessário no Laboratório de Prática de Farmacognosia e principalmente pela amizade sincera e por nos tratar sempre com muita gentileza; e José Maria Marcelino, disposto a ajudar sempre com boa vontade quando precisamos.

Aos funcionários do Centro de Ciência Animal da UFOP em especial à Erika Cristina da Silva Oliveira e à Maria Cristina Ramos Carneiro por disponibilizarem os animais e que sempre estiveram dispostas a nos atender em todas nossas necessidades. A dedicação de vocês foi indispensável na conclusão deste trabalho.

Aos colegas do Mestrado principalmente aos alunos da terceira turma de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial as amigas Renata Tupinambá Branquinho (Renatinha) e Patricia Capelari de Oliveira (Pati) pela amizade, pelas conversas, pela divisão de experiências e por sempre estarem presentes e dispostas a ajudar quando foi necessário. Levo vocês em meu coração.

À Profa. Ms. Liliam Teixeira Oliveira, pelas análises de CLAE e pela gentileza e amizade durante o mestrado.

Aos funcionários do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Multi-usuário da UFMG (LAREMAR) em especial a funcionária Ivana S. Lula pelas análises de RMN.

À Profa. Dra. Lucienir Pains Duarte e aos alunos do Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais da UFMG (NEPLAM) que nos receberam calorosamente em seu laboratório para as análises de CLMP.

À Profa. Dra. Andréa Mendes Nascimento pela identificação dos flavonóides isolados. Agradeço imensamente por ter disponibilizado seu tempo e seu conhecimento com tanta dedicação para colaborar com nosso trabalho.

Aos professores da Escola de Farmácia da Universidade Federal de Ouro Preto que muito contribuíram para minha formação profissional e humana, em especial à Profa. Dra. Elza da Conceição Oliveira Sebastião pela amizade e por ser um exemplo de profissional farmacêutico e à Profa. Dra. Dênia Antunes Saúde Guimarães pelos primeiros ensinamentos na área de produtos naturais e pela oportunidade na iniciação científica.

Aos professores da Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da UFOP que muito contribuíram para minha formação acadêmica.

Aos amigos José das Dores de Oliveira e Daniela de Fátima Turquette, que torceram muito para que este trabalho fosse concluído e que muito me incentivaram e ajudaram quando preciso.

Ao meu pai, José Pinto Brandão, que onde quer que esteja, está sempre torcendo por mim (sei que ele deve estar muito orgulhoso neste momento) e à minha mãe, Maria Íris de Vasconcelos Brandão, que aceitou com paciência minha ausência durante todos estes anos para que eu pudesse me dedicar aos estudos.

Ao meu marido, amigo, companheiro e confidente Antônio José da Cunha Rodrigues que suportou com paciência minhas ausências, minhas crises de estresse e desespero, meu nervosismo; que sempre se mostrou interessado pela minha pesquisa, pelos meus resultados e pelo meu trabalho, mesmo sem entender muitas vezes do que se tratava. Sua presença e apoio tornaram os dias mais felizes. Sem você tudo teria sido mais difícil. Amo você plenamente!

Aos meus familiares em especial à minha madrinha Maria da Consolação Brandão (Dinha) e à minha sobrinha Danúbia Suélen de Sousa Brandão (Dadá) que sempre torceram por mim e que mesmo longe estiveram sempre presentes em ligações, orações e na torcida pra que tudo desse certo.

Ao meu irmão-pai Ricardo Vasconcelos Brandão (não preciso nem justificar os motivos!).

À família Araújo de Freitas, que me aceitou como filha em Ouro Preto e que sempre estiveram preocupados com o meu bem estar. Seu Zé e Lurdinha, serei sempre grata a vocês pelo cuidado e pelo carinho.

À família Querubim: ex-alunas, moradoras e Juliana Barbosa Firmes.

Agradeço carinhosamente a todas as moradoras da República Metamorfose por terem me recebido tão calorosamente em minhas estadias semanais em Ouro Preto após minha mudança para Belo Horizonte.

A FAPEMIG, ao Projeto Grupos Emergentes da Fapemig (CDS APQ-6247-4.04/07) e à UFOP pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.....	xiii
LISTA DE FIGURAS	xvi
LISTA DE TABELAS	xviii
RESUMO	xx
ABSTRACT	xxi
1- INTRODUÇÃO	1
1.1 Importância das Plantas Medicinais e Metabólitos Secundários	1
1.2 Gênero <i>Protium</i> spp	4
1.2.1 Usos Populares	5
1.2.2 Química e Farmacologia	6
1.2.3 A Espécie <i>Protium spruceanum</i>	11
1.3 Propriedade Antioxidante e Compostos Fenólicos	12
1.4 Atividade Antiinflamatória e Analgésica.....	15
2- OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3- MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 Material Botânico	20
3.2 Estudo Fitoquímico.....	20
3.2.1 Processamento do Material Vegetal e Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e das Frações	20
3.2.2 Purificação das Frações e Isolamento de Substâncias.....	22
3.2.2.1 Fração Hexânica	24
3.2.2.1.a) Fração Reunida FH 97-135.....	25
3.2.2.1.a.i Fração Reunida FH 97-135/6-9	26

3.2.2.2 Fração Diclorometânica.....	28
3.2.2.2.a) Fração FDCM 50-60.....	29
3.2.2.2.a.i Fração FDCM 50-60/17-26.....	30
3.2.2.2.a.ii. Fração FDCM 50-60/32-36.....	31
3.2.2.3 Precipitado da Partição MeOH:H ₂ O/CH ₂ Cl ₂	31
3.2.2.3.a) MPLC-4.....	32
3.2.2.4 Fração Metanólica Final (FMEOH-F).....	32
3.2.2.4.a) FMEOH-F 15-25.....	33
3.2.3 Prospecção Fitoquímica.....	34
3.2.3.1 Compostos Fenólicos.....	34
3.2.3.2 Flavonóides e Xantonas.....	34
3.2.3.3 Taninos.....	35
3.2.3.4 Saponinas.....	35
3.2.3.5 Terpenos e Esteróides.....	35
3.2.3.6 Alcalóides.....	36
3.2.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	36
3.2.5 Determinação do Teor de Flavonóides Totais.....	37
3.2.6 Determinação da Propriedade Antioxidante.....	38
3.3 Animais experimentais.....	39
3.4 Experimentos “ <i>in vivo</i> ”.....	39
3.4.1 Avaliação da Atividade Antiedematogênica.....	40
3.4.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	41
3.4.2.1 Método de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético.....	41
3.4.2.2 Método de Placa Quente.....	41
3.4.2.3 Método de Formalina.....	42
3.5 Análise Estatística.....	42

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
4.1 Estudo Fitoquímico.....	43
4.1.1 Fracionamento e Purificação dos Metabólitos de <i>Protium spruceanum</i> (Benth.) Engler.	43
4.1.1.1 Análises de CLAE do Extrato e das Frações de <i>Protium spruceanum</i> por CLAE.....	43
4.1.1.2 Substância IH1/IH2 isolada de FHEX	45
4.1.1.3 Substâncias Isoladas da Fração Diclorometânica.....	50
4.1.1.4 Substância ID1 isolada de PDCM	52
4.1.1.5 Substância MI4 isolada de FMEOH-F	52
4.1.2 Prospecção Fitoquímica	53
4.1.3 Determinação do Teor de Fenóis Totais	54
4.1.4 Determinação do Teor de Flavonóides Totais.....	55
4.1.5 Determinação da Propriedade Antioxidante	57
4.2 Experimentos “ <i>in vivo</i> ”	62
4.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda	62
4.2.2 Avaliação da Atividade Antiedematogênica	63
4.2.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva.....	74
4.2.3.1 Método de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	74
4.2.3.2 Método de Placa Quente.....	82
4.2.3.3 Método de Formalina	86
5- CONCLUSÕES.....	91
6- REFERÊNCIAS	92
7- ANEXOS.....	105

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	porcentagem
% m/v	porcentagem massa por volume
°C	graus Celsius
°GL	graus Gay-Lussac
µg	micrograma
µL	microlitro
µm	micrômetro
¹³ C	isótopo do átomo de carbono de massa 13 u.m.a.
¹ H	isótopo do átomo de hidrogênio de massa 1 u.m.a.
AA	propriedade antioxidante
A _{AMOSTRA}	absorbância da amostra
AcOEt	acetato de etila
A _{DPPH}	absorbância de DPPH
AINES	antiinflamatórios não-esteroidais
CCDC	cromatografia em camada delgada comparativa
CCDP	cromatografia em camada delgada preparativa
CDCl ₃	clorofórmio deuterado
CE ₅₀	concentração efetiva para 50 % de atividade
CEM	cromatografia de exclusão molecular
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas
CH ₂ Cl ₂	diclorometano/cloreto de metileno
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLC	cromatografia líquida clássica em coluna
cm	centímetro
COX-2	enzima ciclooxigenase 2

d	dupleteo
D ₂ O	água deuterada
DAD	detector de arranjo de diodos
DL ₅₀	dose letal para 50 % da população
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
E.P.M.	erro padrão da média
EAG	equivalente de ácido gálico
EEB	extrato etanólico bruto
ERO's	espécies reativas de oxigênio
FDCM	fração diclorometânica
FHEX	fração hexânica
FMEOH-1	fração metanólica da partição Hex-MeOH:H ₂ O
FMEOH-F	fração metanólica da partição CH ₂ Cl ₂ -MeOH:H ₂ O
FT	teor de fenóis totais
FVT	flavonóides totais
g	gramas
h	hora
Hex	hexano
Hz	hertz
INPA	Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia
J	constante de acoplamento
kg	quilograma
m	multipleteo
MeOD	metanol deuterado
MeOH	metanol
mg	miligrama

MHz	megahertz
min	minuto
mL	mililitro
mm	milímetro
nm	nanômetro
PA	para análise
PDCM	precipitado da partição CH ₂ Cl ₂ -MeOH:H ₂ O
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PPM	partes por milhão
PVDF	fluoreto de polivinilideno
RMN	ressonância magnética nuclear
s	singleto
SE	solução estoque
t	triplete
TI	tempo de irritação
TL	tempo de latência
TPA	acetato de 12- <i>O</i> -tetradecanoilforbol
T _R	tempo de retenção
u.m.a.	unidade de massa atômica
UVA	radiação ultravioleta A
UV-VIS	ultravioleta-visível
v.ip.	via intraperitonal
v.o.	via oral
v.sp.	via subplantar
δ	deslocamento químico

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Exemplar de <i>Protium spruceanum</i>	11
Figura 2:	Esquema do processo de obtenção do extrato etanólico bruto de folhas de <i>Protium spruceanum</i> Beth. (Engler) e do seu fracionamento	21
Figura 3:	Análises do perfil cromatográfico por CLAE do extrato e das frações de <i>Protium spruceanum</i> . A - EEB, B - PDCM, C - FDCM, D - FMEOH-F e E – FHEX	44
Figura 4:	Estrutura química da α -amirina (A) e da β -amirina (B)	45
Figura 5:	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) para a substância IH1/IH2	46
Figura 6:	Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para a substância IH1/IH2	48
Figura 7:	Esqueleto básico de um composto flavonoídico, onde R corresponde ao substituinte	51
Figura 8:	Representação gráfica dos resultados de determinação do teor de FVT para EEB e frações de folhas de <i>Protium spruceanum</i> . A – mg EQ/g de amostra, B – mg ER/g de amostra	56
Figura 9:	Propriedade antioxidante <i>versus</i> Concentração ($\mu\text{g/mL}$) para o EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> e para as frações do EEB	59
Figura 10:	Comparação dos valores de CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) de propriedade antioxidante do EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> e das frações do EEB <i>versus</i> ácido gálico. A – EEB, MEOH-1 e FHEX. B – FMEOH-F, FDCM, PDCM	61
Figura 11:	Efeito da administração oral de EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira hora (A) e quarta hora (B)	65
Figura 12:	Efeito da administração oral de FMEOH-1 e FHEX após partição do EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira hora (A) e quarta hora (B)	69
Figura 13:	Efeito da administração oral de FMEOH-F, FDCM e PDCM após partição da FMEOH-1 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira (A) e na quarta (B) horas	72
Figura 14:	Efeito da administração oral do EEB de <i>Protium spruceanum</i> no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos	76
Figura 15:	Efeito da administração oral das frações FMEOH-1 e FHEX após partição do	

	EEB de <i>Protium spruceanum</i> (HEX/MeOH:H ₂ O 9:1) no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos	78
Figura 16:	Efeito da administração oral das frações FMEOH-F, PDCM e FDCM após partição da FMEOH-1 no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos	81
Figura 17:	Efeito da administração oral do EEB de <i>Protium spruceanum</i> no tempo de latência para o método de placa quente em camundongos	83
Figura 18:	Efeito da administração oral das frações FMEOH-1 e FHEX após partição do EEB de <i>Protium spruceanum</i> (HEX/MeOH:H ₂ O 9:1) no tempo de latência para o método de placa quente em camundongos	85
Figura 19:	Efeito da administração oral do extrato e das frações de <i>Protium spruceanum</i> sobre o tempo de irritação para o método de nocicepção induzida por formalina ..	88

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Exemplos de espécies do gênero <i>Protium</i> e seus respectivos nomes populares	5
Tabela 2:	Frações de FHEX obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	25
Tabela 3:	Frações de FH 97-135 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	26
Tabela 4:	Frações de FH 97-135/6-9 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	27
Tabela 5:	Frações de FDCM obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	29
Tabela 6:	Frações de FDCM 50-60 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	30
Tabela 7:	Frações de FMEOH-F obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade	33
Tabela 8:	Deslocamentos químicos (δ) em ppm obtidos do espectro de RMN de ^{13}C para a substância IH1/IH2 a 100 MHz em CDCl_3 , comparados com dados publicados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994)	49
Tabela 9:	Deslocamentos químicos obtidos para o heterosídeo ramnose de ID2 comparados com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989)	51
Tabela 10:	Deslocamentos químicos obtidos para o heterosídeo ramnose de MI4 comparados com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989)	53
Tabela 11:	Avaliação da presença dos principais metabólitos secundários no EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i>	54
Tabela 12:	Resultados da determinação do teor de FVT para EEB e frações das folhas de <i>Protium spruceanum</i>	55
Tabela 13:	Porcentagem de propriedade antioxidante obtida para EEB e frações das folhas de <i>Protium spruceanum</i>	58
Tabela 14:	CE_{50} para EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> e para as frações FHEX e FMEOH-1	59
Tabela 15:	CE_{50} para as frações obtidas após a partição de FMEOH-1 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1)	60

Tabela 16:	Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i>	64
Tabela 17:	Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para FMEOH-1 e FHEX	67
Tabela 18:	Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para FMEOH-F, FDCM e PDCM	71
Tabela 19:	Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i>	75
Tabela 20:	Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para FHEX e FMEOH-1	77
Tabela 21:	Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para FDCM, FMEOH-F e PDCM	80
Tabela 22:	Resposta da administração de EEB no método de placa quente	82
Tabela 23:	Resposta da administração de FMEOH-1 e FHEX no método de placa quente	84
Tabela 24:	Resposta da administração de EEB das folhas de <i>Protium spruceanum</i> e das frações FMEOH-1 e FHEX para o método de formalina	87

RESUMO

Nesta dissertação foi realizado o estudo biomonitorado das atividades analgésica e antiinflamatória *in vivo* e da propriedade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. Foram utilizados ensaios de detecção das principais classes de metabólitos secundários presentes no EEB e técnicas cromatográficas para isolamento de constituintes majoritários das frações mais ativas. Os teores de FT e de FVT foram determinados por métodos espectrométricos. As atividades farmacológicas *in vivo* foram avaliadas pelo método de edema de pata induzido por carragenina para determinar a atividade antiinflamatória e métodos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina para determinação da atividade antinociceptiva. A toxicidade aguda foi determinada a fim de avaliar os efeitos tóxicos do EEB. Observou-se a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonóides, saponinas, triterpenos, esteróides, xantonas e cumarinas. O constituinte majoritário encontrado na fração FHEX foi a mistura de α e β -amirinas. Nas frações FDCM e FMEOH-F foram isolados três flavonóides, ainda em fase de identificação. Na determinação da propriedade antioxidante foram observados resultados significativos para EEB e frações FMEOH-1, FDCM e PDCM comparadas ao padrão de ácido gálico, onde FDCM apresentou melhor resultado. O EEB apresentou aproximadamente 18 % de compostos fenólicos e a fração FDCM apresentou maior teor de FVT. Na avaliação da atividade antiinflamatória foi possível observar atividade significativa para FHEX e FMEOH-1. Após o fracionamento de FMEOH-1, as frações FMEOH-F e FDCM apresentaram atividade significativa. Observou-se também significativa atividade antinociceptiva para as frações FHEX e FMEOH-1 frente ao método de contorções abdominais. Pelo método de placa quente, o EEB, na maior dose administrada, foi capaz de aumentar o TL inicial após 60 minutos da administração, e após a partição, apenas a FHEX apresentou atividade antinociceptiva significativa. No modelo de formalina, o EEB e a FHEX apresentaram atividade antinociceptiva apenas na Fase II. As atividades analgésica central e periférica, e antiinflamatória da FHEX podem ser atribuídas a presença da mistura dos triterpenos α e β -amirina, principal constituinte desta fração. A atividade antiinflamatória das frações FMEOH-1, FMEOH-F e FDCM pode ser atribuída ao considerável teor de compostos fenólicos, principalmente flavonóides, nestas frações. Não foi possível estabelecer a DL_{50} em camundongos para a administração do EEB até a dose de 6 g/kg.

ABSTRACT

The aim of this work was to perform the bioactivity study of analgesic and anti-inflammatory activities *in vivo* and antioxidant property *in vitro* of crude ethanolic extract (EEB) from *Protium spruceanum* leaves. Were used for phytochemical screening tests to detect the main classes of secondary metabolites presents in the EEB and chromatographic techniques for isolation of the major constituents of the most active fractions. The content of FVT and FT were determined by spectroscopic methods. For evaluation of pharmacological activities *in vivo* was utilized paw edema induced by carrageenan method to determine the anti-inflammatory activity and methods of writhing induced by acetic acid, hot plate and formalin for determination of antinociceptive activity. The acute toxicity was determined to assess the toxic effects of EEB. The phytochemical screening revealed the presence of phenolic compounds, tannins, flavonoids, saponins, triterpenes, steroids, coumarins and xanthenes. The major constituent found in FHEX fraction was a mixture of α and β -amyrin. In the fractions FDCM and FMEOH-F were isolated three flavonoids that are still being identified. Bether antioxidant properties were observed for EEB and the more polar fractions FMEOH-1, FDCM and PDCM compared to the standard gallic acid. FDCM showed the highest activity. The EEB showed approximately 18% of phenolics compounds and in FDCM was observed the highest level of FVT. FHEX and FMEOH-1 showed antiinflammatory activity and after fractionation, FMEOH-F and FDCM showed significant antiinflammatory activity. In the writhing test, both fractions, FHEX and FMEOH-1 presents significative activity. For the hot plate method the EEB, in the highest dose administered, has been able to increase the TL initial 60 minutes after the administration and after fractionation, only FHEX showed significative activity. For the formalin method, the EEB and FHEX showed antinociceptive activity only in Phase II. The central and peripheral analgesic and anti-inflammatory of FHEX can be attributed to the presence of α and β -amyrin, the main constituent of this fraction. The anti-inflammatory activity of FMEOH-1, FMEOH-F and FDCM fractions can be attributed to the considerable amounts of phenolic compounds, especially flavonoids, in these fractions. It was impossible to establish the DL₅₀ in mice for EEB until the administration of the dose of 6 g / kg.

1- INTRODUÇÃO

“Outras formas de descobertas dos efeitos terapêuticos das plantas se encontram em inúmeras práticas, tais como: o uso de amuletos, a cura por meio de orações que, muitas vezes, utilizam plantas para o benzimento, em rituais africanos, indígenas e outros. Todas essas manifestações contribuíram, graças ao seu componente empírico, com a seleção e a incorporação de espécies vegetais como plantas medicinais eficazes. Estes exemplos mostram-se suficientes para caracterizar a importância e a relevância, não apenas dos magos, bruxos, feiticeiros e alquimistas mas também do conhecimento disseminado por toda a população, os quais contribuem amplamente para o conhecimento da natureza e servem como subsídio básico, e de extremo valor, para a seleção de plantas medicinais para estudos detalhados voltados para a obtenção de novos medicamentos.”

(Di Stasi)

1.1 Importância das Plantas Medicinais e Metabólitos Secundários

Os produtos naturais, tem se apresentado como principal fonte de substâncias ativas aplicadas na terapêutica. A utilização de plantas para fins terapêuticos é uma prática milenar, cujos primeiros relatos datam de aproximadamente de 78 a.C, quando Discorides escreveu “A Matéria Médica” relatando a utilização de várias espécies vegetais de uso terapêutico (EBADI, 2006).

As plantas medicinais eram utilizadas de maneira empírica, sendo o conhecimento de suas utilizações passado de geração em geração por meio de relatos em livros ou até mesmo verbalmente. O conhecimento popular da utilização dessas plantas medicinais no tratamento de várias enfermidades permitiu, com o passar dos tempos, uma seleção de espécies de maior interesse para futuros estudos e pesquisas aplicadas à terapêutica (DA CUNHA et al., 2003).

A abordagem etnofarmacológica, que utiliza justamente o conhecimento da população com relação à medicina tradicional para nortear a exploração científica, constitui uma importante estratégia para investigar plantas medicinais (GERTSCH, 2009) e tem contribuído ao longo dos anos para que as atividades farmacológicas de várias plantas sejam comprovadas.

Até o século XIX, as plantas e seus extrativos, constituíam a maioria dos medicamentos, que a partir de então, começaram a ser estudados com o auxílio de instrumentos científicos da época; e passou-se a utilizar as substâncias ativas isoladas para

fins terapêuticos (SIMÕES et al., 2004). Com o advento da Química Farmacêutica e da síntese orgânica de vários compostos de utilidade terapêutica, a medicina tradicional sofreu significativa queda em seu uso (ROBBERS et al., 1997).

Entretanto, desde a década de 60 observou-se um crescente interesse por terapias consideradas alternativas no mundo, principalmente a fitoterapia (DA CUNHA et al., 2003) que é denominada como o preparo de medicamentos com propriedades terapêuticas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, produzidos exclusivamente a partir de plantas ou partes delas sem o uso de substâncias ativas isoladas (ARNOUS et al., 2005)

Nos países desenvolvidos a produção, e conseqüente utilização, dos fitoterápicos passaram a ser regidas por leis que visassem a qualidade, segurança e eficácia do produto final (DA CUNHA et al., 2003). As regras da legislação européia determinam, por exemplo, que a propaganda de produtos relacionados a ervas medicinais só possa ser veiculada mediante autorização que se baseia nos resultados de testes que comprovem eficácia, qualidade e segurança (VEIGA JR. et al., 2005).

Nos Estados Unidos, a qualidade, eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos são avaliadas exatamente como as dos medicamentos convencionais. Os fitoterápicos são submetidos a processos de caracterização por técnicas avançadas e são produzidos sob as mesmas e rigorosas condições que regulamentam os medicamentos convencionais (SCHIMIDT et al., 2008).

Assim, a essas formas mais elaboradas foram agregados valores que refletiram no custo do produto final. Esses valores, responsáveis pela movimentação de grandes cifras no mercado mundial, despertou grande interesse da indústria farmacêutica mesmo diante de uma legislação rigorosa (DA CUNHA et al., 2003). Além disso, o interesse da população por utilizar medicamentos fitoterápicos com a idéia de que são naturais e que não oferecem riscos, faz com que a venda de fitoterápicos cresça a cada ano.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), responsável por fiscalizar a normatização do registro de fitoterápicos, determina que sejam realizados testes de controle de qualidade de fitoterápicos pelas empresas produtoras de modo a atestar, além da segurança e da eficácia dos medicamentos, as normas de produção e controle de qualidade. Dentre alguns destes testes podem se destacar o controle de qualidade do produto acabado, com métodos analíticos que incluam perfis cromatográficos e resultados de

prospecção fitoquímica, além de comprovação de segurança de uso, incluindo estudos de toxicidade pré-clínica (VEIGA JR. et al., 2005).

A divulgação de resultados envolvendo estudos sobre a química e farmacologia de produtos naturais, em várias partes do mundo, tem resultado em um aumento da conscientização do potencial de biodiversidade e da necessidade de garantir o uso e a sustentabilidade de pesquisas de produtos naturais (DE ALBUQUERQUE et al., 2007).

Desta maneira, as potencialidades de uso de plantas medicinais e de pesquisas na área de produtos naturais encontram-se longe estarem esgotadas buscando o desenvolvimento e a melhoria dos recursos terapêuticos disponíveis.

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do mundo, bem como uma enorme diversidade cultural. Além disto, possui uma enorme quantidade de plantas utilizadas pela população com alto potencial econômico/terapêutico (DE ALBUQUERQUE et al., 2007). No entanto, maior conhecimento e estudos detalhados a respeito da exploração racional e do impacto do uso desses recursos naturais são necessários para melhor entendimento e utilização dos recursos oferecidos pela natureza.

Principalmente os vegetais e os microorganismos possuem a capacidade de metabolizar diversas substâncias que não estão necessariamente relacionadas de forma direta à manutenção da vida deste organismo. Essas substâncias podem ou não ser restritas a um determinado grupo de organismos, mas de certa forma garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie (SIMÕES et al., 2004). Este conjunto de metabólitos é denominado, por Gottlieb e colaboradores, como Metabólitos Secundários (especiais) e são originados a partir dos Metabólitos Primários, responsáveis por fornecer matéria prima e energia para a produção dos Metabólitos “especiais” (GOTTLIEB et al., 1996).

Os Metabólitos Secundários são substâncias que, na maioria das vezes, exercem fatores de interação entre organismos e desta maneira, freqüentemente apresentam diversas atividades biológicas de interesse e farmacologicamente importantes (SIMÕES et al., 2004).

Várias são as classes de Metabólitos Secundários, dentre elas se destacam triterpenos, compostos fenólicos em geral, flavonóides e alcalóides. Esses compostos possuem uma gama imensa de atividades farmacológicas, tais como antiinflamatória, antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, ação sobre o Sistema Nervoso Central dentre outras inúmeras atividades.

Portanto, as fontes de Metabólitos Secundários parecem ser inesgotáveis em relação as possibilidades de se encontrar novas e diferentes estruturas com atividades de extrema importância medicinal e comercial (YUNES & CALIXTO, 2001).

1.2 Gênero *Protium* spp

A família Burseraceae é composta por 21 gêneros distribuídos em três tribos: Bowellieae (8 gêneros), Canarieae (9 gêneros) e Protieae (4 gêneros) (KHALID, 1983) e possui aproximadamente 800 espécies espalhadas por regiões tropicais e subtropicais do planeta (BANDEIRA et al., 2002).

Esta família é bastante conhecida por seus exsudatos e oleoresinas ricas em substâncias voláteis que são utilizadas para várias finalidades, como por exemplo, na perfumaria (PONTES et al., 2007). Estas resinas aromáticas tem sido amplamente utilizadas para diversas aplicações por tribos nativas das regiões onde são encontradas (SIANI & VEIGA JUNIOR, 2007).

Algumas espécies dessa família apresentam-se como árvores de pequeno ou médio porte, no entanto outras espécies podem ocorrer como árvores de grande porte até pequenos arbustos. Todas as espécies da família geralmente florescem no final do período de seca. A grande maioria das espécies da família Burseraceae são indicadores de vegetação relativamente intacta, uma vez que poucas espécies ocorrem no crescimento secundário (MAIA et al., 2000).

Dentre os relatos literários de estudos realizados com espécies da família Burseraceae, pode-se destacar alguns estudos fitoquímicos para determinação da composição química de óleos essenciais e de extratos das resinas de *Canarium luzonicum*, *Bursera cuneata* e *Trattinnickia rhoifolia* (RAMOS et al., 2003; CRUZ-CAÑIZARES et al., 2005).

Estudos realizados no Japão com resina de *Boswellia carteri* demonstraram que o extrato e frações do extrato da resina possuem atividade antiinflamatória para o teste de edema de orelha induzido por TPA. A atividade foi atribuída a ácidos terpênicos isolados da espécie (BANNO et al., 2006).

Recentemente, foi realizado o estudo biomonitorado para avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hexânico das folhas de *Bursera simaruba*. Este extrato apresentou significativa atividade antiinflamatória demonstrada pelo método de edema de

pata induzido por carragenina em ratos. Segundo os pesquisadores, esteróis e o triterpeno α -amirina seriam os principais constituintes ativos responsáveis pela atividade antiinflamatória (CARRETERO et al., 2008).

A tribo Protieae está distribuída em três gêneros: *Garuga*, *Tetragastris* e *Protium* (OLIVEIRA, 2005). Este último, que possui aproximadamente 135 espécies, é considerado o principal e mais importante gênero da família. O gênero *Protium* está amplamente distribuído na América do Sul e estima-se que mais de 80% das espécies da família Burseraceae encontradas na Região Amazônica pertencem a este gênero (SIANI et al., 1999; SIANI et al., 2004; KHALID, 1983). As óleo-resinas produzidas pelas espécies do gênero *Protium* são popularmente conhecidas nesta região como “breus”.

1.2.1 Usos Populares

Na medicina popular, gomas e óleo-resinas de espécies de *Protium* são utilizadas para diversas enfermidades, como tônico e estimulante, para o tratamento de ulcerações, de inflamações e como repelente de insetos (SIANI et al., 1999; SIANI et al., 2004). Também existem relatos populares de usos como expectorante e cicatrizante, além das resinas de espécies de *Protium* serem usadas na indústria de verniz, na calafetagem de embarcações (BANDEIRA et al., 2002) e como incensos em rituais religiosos (MAIA et al., 2000).

Exemplos de espécies de *Protium* e respectivos nomes populares estão listados na Tabela 1.

Tabela 1: Exemplos de espécies do gênero *Protium* e seus respectivos nomes populares

Espécie	Nome popular	Referência
<i>Protium heptaphyllum</i>	Almecegueira, breu-branco-verdadeiro, almecegueira	MAIA, 2000
	cheirosa, almecegueira de cheiro, almecegueira	ALMEIDA, 2001
	vermelha, almecegueiro bravo, almécega, breu-branco,	BANDEIRA, 2002
	goma-limão	VIEIRA-JR, 2005
		ARAGÃO, 2006
<i>Protium kleinii</i>	Almécega, almíscar, pau-de-breu, guapoi	LIMA, 2005
<i>Protium unifoliolatum</i>	Breuzinho, breu branco da várzea,	MAGALHÃES, 2006
<i>Protium spruceanum</i>	Breu, almécega de casca lisa	VIEIRA, 2005

1.2.2 Química e Farmacologia

Apesar de o gênero *Protium* ser o principal e mais importante gênero da família Burseraceae e apesar de mais de 80% das espécies da família Burseraceae na Região Amazônica pertencerem a este gênero (SIANI et al., 1999; SIANI et al., 2004; KHALID, 1983), encontram-se relatos na literatura de estudos de apenas 14 dessas espécies.

Em países da América do Sul como a Bolívia, em parceria com grupos de pesquisadores franceses, foram realizados estudos de seleção de espécies vegetais para atividades antiparasitárias, justamente para comprovar e validar alguns usos populares de espécies vegetais da flora sul-americana. Assim, espécies do gênero *Protium* se destacaram nesses estudos. Alguns desses estudos revelaram a participação de metabólitos secundários da classe dos diterpenos como sendo os possíveis responsáveis por essas atividades (SANCHEZ et al., 2006; DEHARO et al., 2001; WENIGER et al., 2001; FOURNET et al., 1992). No entanto, pouco se sabe sobre a fitoquímica desse gênero.

A espécie *Protium heptaphyllum* é a mais estudada e existem diversos relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos e farmacológicos desta espécie.

A partir da resina de *Protium heptaphyllum*, misturas binárias de triterpenos foram isoladas e caracterizadas, sendo o constituinte majoritário a mistura α e β -amirinas (MAIA et al., 2000; SUSUNAGA et al., 2001).

Bandeira e colaboradores (2002) estenderam os estudos previamente realizados com a resina, trabalhando também com caule, folhas e frutos. Neste estudo os pesquisadores obtiveram a partir da resina o rendimento de 11% de óleo essencial além de isolarem um monoterpeno trihidroxilado, e os triterpenos α e β -amirinas, e breina. Dos frutos verdes foi isolada catequina e dos frutos maduros e das folhas foram isolados quercetina e glicosídeos deste flavonóide. A partir do caule os pesquisadores isolaram escopoletina, relatando pela primeira vez metabólitos secundários diferentes de terpenos na espécie. A resina e a catequina isolada apresentaram atividade de inibição da Acetilcolinesterase *in vitro* (BANDEIRA et al., 2002).

Em estudos realizados com as cascas e as folhas de *Protium heptaphyllum*, pesquisadores de Alagoas, Brasil, identificaram pela primeira vez a presença de cumarinas em uma espécie da família Burseraceae. Também foi a primeira vez que Cleomiscosina A foi isolada na família Burseraceae (ALMEIDA et al., 2002).

Estudos recentes desta espécie comprovaram a atividade antiinflamatória e demonstraram quadro de atividade de gastroproteção em modelos utilizando etanol/HCl como indutores de úlceras gástricas em ratos, atribuindo essas atividades a substâncias com alto poder antioxidante encontradas em sua resina. Este mesmo estudo revelou a presença de triterpenos pentacíclicos responsáveis pelas atividades avaliadas (OLIVEIRA et al., 2004a).

Os mesmos autores deram continuidade aos estudos fitoquímicos e farmacológicos, realizando estudos com a mistura α e β -amirinas, isolada da resina de *Protium heptaphyllum*. Neste estudo, verificaram a atividade antialérgica que pode estar relacionada com a ação dessa mistura estabilizando a membrana celular de mastócitos (OLIVEIRA et al., 2004b). Além das atividades gastroprotetora, antiinflamatória e antialérgica, outros estudos de Oliveira e colaboradores (2005) mostram o potencial efeito hepatoprotetor da mistura α e β -amirinas contra lesão hepática tóxica induzida por acetaminofeno e sugerem a diminuição do estresse oxidativo e da formação de metabólitos tóxicos como provável mecanismo de hepatoproteção (OLIVEIRA et al., 2005).

Em estudos realizados em 2005, também com a resina de almécega, pesquisadores da Universidade Federal do Piauí isolaram três misturas de triterpenos pentacíclicos, totalizando 7 substâncias que foram identificados como α -amirina, β -amirina, breína, maniladiol, α -amirinona, β -amirinona e lupenona. Estes pesquisadores consideraram que a resina de *Protium heptaphyllum* é uma fonte alternativa para obtenção de α e β -amirinas em quantidade significativa (VIEIRA JÚNIOR et al., 2005).

A administração oral da mistura α e β -amirinas (3-100mg/kg), isolada da resina de *Protium heptaphyllum*, suprimiu os efeitos nociceptivos provocados pela injeção subplantar e intracolônica de capsaicina. Essa ação, suprimida pela presença de naloxona, sugere que a ação analgésica da mistura se dá por mecanismos relacionados a receptores opióides (OLIVEIRA et al., 2005). Estudos realizados com a mistura α e β -amirinas não mostraram comprometimento da locomoção espontânea (OLIVEIRA et al., 2004b) ou da coordenação motora, indicando ausência de efeitos sedativos e de alterações motoras (OLIVEIRA et al., 2005).

Citó e colaboradores (2006) realizaram estudos fitoquímicos com a finalidade de identificar os constituintes voláteis de óleo essencial de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* por CG/EM obtidos por diferentes técnicas de extração. Neste estudo, observaram que o constituinte majoritário variou de acordo com a técnica de extração

utilizada. Os constituintes majoritários dos frutos foram limoneno (hidrodestilação) e δ -3-careno (“*headspace*”) e das folhas β -cariofileno para ambas as técnicas (CITÓ et al., 2006).

A atividade ansiolítica e antidepressiva da mistura α e β -amirinas, isolada da resina de *Protium heptaphyllum* foi avaliada pelos métodos de campo aberto, labirinto em cruz elevado, haste girante, nado forçado e tempo de sono induzido por pentobarbital por Aragão e colaboradores em 2006. A mistura α e β -amirinas demonstrou efeitos sedativo e ansiolítico que podem estar relacionados a ação em receptores do tipo benzodiazepínicos e efeito antidepressivo onde mecanismos noradrenérgicos provavelmente estão envolvidos (ARAGÃO et al., 2006).

O óleo essencial de folhas e frutos de *Protium heptaphyllum* foi analisado por CG/EM e o efeito antiacaricida foi avaliado contra o ácaro rajado (*Tetranychus urticae*). Este estudo mostrou que o componente majoritário no óleo dos frutos foi o α -terpineno (47,6%) e que no óleo das folhas foram 9-epi-canofileno (21,4%), trans-isolongifolanona (10,7%) e 14-hidroxi-9-epi-canofileno (16,7%). Mostrou também que apenas o óleo essencial dos frutos induziu a repelência ao *Tetranychus urticae* (PONTES et al., 2007).

Transformações químicas envolvendo a reação na ligação C-3 do anel A de α e β -amirinas foram realizadas e foram obtidos derivados do tipo ésteres (formiato, acetato, benzoato e cinamato) e cetonas reportados pela primeira vez na literatura (BANDEIRA et al., 2007).

Estudos com a mistura α e β -amirinas isolada da resina de *Protium heptaphyllum* para avaliação da atividade antinociceptiva da mistura, demonstraram que na dose de 30 mg/kg a mistura reduz o tempo de resposta nociceptiva na segunda fase do teste de formalina e na dose de 100 mg/kg inibe dor orofacial induzida por capsaicina provavelmente através de mecanismos opióides (HOLANDA PINTO et al., 2008).

Em estudos recentes, cinco derivados dos triterpenos α e β -amirina foram sintetizados e identificados. A atividade antinociceptiva desses compostos foi avaliada pelo modelo de nocicepção induzida pelo ácido acético e três desses derivados foram mais potentes que a mistura de α e β -amirinas. Um desses compostos também teve significativa atividade analgésica na fase II do teste de formalina (SOLDI et al., 2008).

Com relação às demais espécies do gênero *Protium*, poucos relatos podem ser encontrados na literatura. Um dos primeiros estudos fitoquímicos publicados direcionado especificamente a uma espécie do gênero data de 1993. Neste estudo, foram identificados alguns constituintes químicos do extrato etéreo e etanólico da casca da madeira de *Protium*

paniculatum. Do extrato etéreo, os pesquisadores isolaram os terpenos α e β amirinas além dos fitoesteróides estigmasterol e β -sitosterol. Do extrato etanólico foi possível isolar o ácido 3,3'-di-*O*-metilelágico, identificado pela primeira vez no gênero (ZOGHBI et al., 1993).

Análises fitoquímicas demonstraram que o óleo essencial da resina de *Protium heptaphyllum* é constituído principalmente de monoterpenos e fenilpropanóides, já os constituintes majoritários do óleo essencial das folhas de *Protium strumosum*, *Protium grandifolium*, *Protium lewellyni* e *Protium hebetatum* foram os sesquiterpenos (SIANI et al., 1999).

Relatos da avaliação dos efeitos farmacológicos mostraram que os óleos essenciais de *Protium heptaphyllum*, *Protium strumosum* e *Protium lewellyni* inibiram o extravasamento de proteínas no teste de inflamação da pleura induzido por zimozano, entretanto não foram capazes de inibir a contagem total ou diferencial de leucócitos. Os óleos de *Protium heptaphyllum* e de *Protium strumosum* também foram capazes de inibir a produção de óxido nítrico *in vitro* (SIANI et al., 1999).

Estudos realizados com o extrato etéreo da resina de *Protium kleinii* mostraram a presença do triterpeno breína, isolada como um dos principais constituintes. Neste estudo, os pesquisadores avaliaram a atividade antinociceptiva do extrato utilizando alguns modelos de nocicepção em camundongos, obtendo resultados promissores. O extrato, administrado por via sistêmica, apresentou atividade antinociceptiva considerável e dose-dependente nos métodos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, de dor induzida por capsaicina e em ambas as fases do método de irritação induzida por formalina. Entretanto, a atividade não foi verificada nos métodos de placa quente e de retirada da cauda (OTUKI et al., 2001). A atividade foi atribuída à breína, que já havia sido isolada e teve sua atividade antiinflamatória investigada anteriormente quando isolada de *Canarium album* (YASUKAWA et al., 1996).

Os mesmos autores, continuaram seus estudos e avaliaram a atividade antiinflamatória tópica do extrato etéreo da resina de *Protium kleinii* utilizando o modelo de edema de orelha induzido por ácido aracônico e TPA. Obtiveram como constituinte majoritário a mistura triterpênica α e β -amirinas e nos estudos farmacológicos, tanto o extrato quanto a α -amirina apresentaram considerável atividade antiinflamatória, dose-dependente (OTUKI et al., 2005).

Também o mesmo grupo de pesquisadores de Santa Catarina e no mesmo ano, isolaram e identificaram três novos triterpenos a partir da resina de *Protium kleinii* e a atividade antinociceptiva desses compostos foi comprovada pelo teste de formalina (LIMA et al., 2005).

Dando continuidade aos trabalhos realizados em 2005 na Universidade Federal de Santa Catarina, Medeiros e colaboradores (2007) descobriram que a atividade antiinflamatória tópica da α -amirina, já demonstrada por seu grupo de pesquisa (OTUKI, 2005), pode estar associada a supressão na pele dos níveis de PGE-2 provavelmente por mecanismos envolvendo a supressão da COX-2 (MEDEIROS et al., 2007a).

Pesquisas foram realizadas com os óleos essenciais da resina, das folhas e dos frutos de *Protium icicariba* e foi possível demonstrar que o óleo essencial da resina é exclusivamente composto de monoterpenos que também estão predominantemente na constituição do óleo essencial dos frutos. Entretanto, o óleo essencial das folhas é constituído majoritariamente de sesquiterpenos, com quantidades significativas de monoterpenos (SIANI et al., 2004).

Análises da composição química da resina de *Protium altosonii* foram realizadas por CG/EM em 2005 e a mistura α e β -amirinas (65%) foi identificada como constituinte majoritário (BERTAN et al., 2005).

Outra espécie que também teve atenção de pesquisadores foi *Protium unifoliolatum*. A partir do extrato etéreo da resina desta planta, um novo composto foi isolado e identificado, denominado 5-Methoxipropacina (MAGALHÃES et al., 2006).

A análise da composição química dos óleos essenciais das partes vegetativas de *Protium decandrum* foi realizada por pesquisadores do INPA e da UNICAMP. As análises de CG/EM mostraram que sesquiterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais de galhos, folhas e resina. Entretanto, no óleo essencial das hastes desta espécie, a maior porcentagem é de monoterpenos (LIMA et al., 2006).

Outra espécie que teve sua resina submetida a análises fitoquímicas foi *Protium bahianum*. Os estudos foram realizados com óleos essenciais da resina fresca e envelhecida. Neste estudo verificou-se que o óleo da resina envelhecida possui em sua constituição, majoritariamente sesquiterpenos. Já no óleo da resina fresca não foram encontrados sesquiterpenos e sim basicamente monoterpenos. Estes óleos tiveram a atividade antiacaricida avaliada e apenas a resina envelhecida induziu repelência a *Tetranychus urticae* (PONTES et al., 2007).

Apesar destes estudos farmacológicos realizados com algumas espécies do gênero, apenas uma dessas espécies está disponível no mercado, não para fins terapêuticos, mas cosméticos. Segundo informações disponibilizadas no site da empresa Natura, em março de 2001, a empresa iniciou pesquisas em comunidades e mercados no norte do Brasil, a fim de buscar aromas inovadores e ousados. (NATURA/Brasil, 2010a). Um desses aromas inovadores e ousados procurados pela empresa foi encontrado no Breu Branco, nome popular da resina de odor agradável e fresco obtida de *Protium pallidum*. O óleo essencial da resina desta espécie, nunca utilizado na perfumaria mundial, é utilizado como matéria prima para produção de um perfume genuinamente brasileiro (NATURA/Brasil, 2010b).

1.2.3 A Espécie *Protium spruceanum*

Embora alguns estudos já tenham sido realizados com algumas espécies do gênero *Protium*, existe apenas um relato na literatura de trabalhos fitoquímicos publicados com relação à espécie *Protium spruceanum* (Figura 1). Este trabalho avaliou a variação sazonal na composição de óleos essenciais das folhas, dos ramos finos e da resina da espécie. Durante a maturação dos frutos e nos meses de verão, o teor de monoterpenos no óleo essencial das folhas é menor. Esta variação pode estar relacionada à taxa de biossíntese, à diminuição do metabolismo ou à volatilização (MACHADO et al., 2003).



Figura 1: Exemplar de *Protium spruceanum* (Fonte: Prof. Dr. Gustavo Henrique Bianco de Souza)

Esta espécie, objeto de estudo por pesquisadores de Lavras-MG quanto à sua fitossociologia, é conhecida popularmente como almécega-de-casca-lisa ou breu. É uma espécie arbórea semidecídua de ampla distribuição, ocorrendo nas florestas úmidas Atlânticas e Amazônicas, encontrada também em cerrado, exclusivamente no interior das matas ciliares e em solos encharcados. A floração de *Protium spruceanum*, ocorre com maior intensidade entre os meses de setembro e outubro. As flores estão dispostas em inflorescência do tipo panículos ramosas axilares e as flores são geralmente unissexuadas. A frutificação ocorre a partir do mês de setembro. Seu fruto é uma baga subglobosa, de superfície lisa e brilhante, de cor vermelha, contendo de 1 a 2 sementes envoltas por um arilo fino e adocicado, largamente apreciado pela avifauna (LOBO-FARIA, 1998; VIEIRA, 2005).

Entretanto, não existem relatos na literatura sobre a comprovação de nenhuma atividade farmacológica para a espécie, o que motivou nosso grupo de pesquisa a avaliar as atividades analgésica e antiinflamatória de *Protium spruceanum*.

1.3 Propriedade Antioxidante e Compostos Fenólicos

“O oxigênio constitui tanto um benefício quanto uma ameaça aos organismos vivos e aqueles que se capacitaram a usufruir de seus benefícios tiveram, por necessidade, de desenvolver uma série de defesas contra seus perigos.”

(FRIDOVICH, 1977)

O termo espécies reativas de oxigênio (ERO's) é utilizado para designar agentes reativos patogênicos originários do metabolismo do oxigênio que podem ou não possuir elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica (FERREIRA & MATSUBARA, 1997). As ERO's são encontradas em todos os sistemas biológicos e podem interagir com outras moléculas por um processo conhecido por supressão física que se baseia na transferência de energia de excitação para tais moléculas. Este processo pode ser realizado por algumas substâncias naturais, tais como carotenóides, tocoferóis e fenóis (ROSEIN et al., 2006).

A produção de ERO's é parte integrante do metabolismo humano. Em condições fisiológicas as ERO's tem importante função biológica como na fagocitose de agentes

patogênicos, no controle da pressão sanguínea, na sinalização celular, na apoptose, dentre outras (VASCONCELOS et al., 2007).

As ERO's podem ser produzidas por fontes endógenas tais como mitocôndrias durante o crescimento celular, enzimas do citocromo P450 dentre outras (SEIFRIEDA et al., 2007) ou podem ser obtidas por fontes exógenas. As principais fontes exógenas de ERO's são: radiação UVA, cigarro, solventes orgânicos, o herbicida paraquat e paracetamol, dentre outros (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

Quando ocorre a produção aumentada dessas substâncias, o sistema antioxidante natural do organismo é capaz de controlar e restabelecer o equilíbrio. (VASCONCELOS et al., 2007). Este mecanismo de defesa pode envolver mecanismos preventivos, de reparo, defesas físicas e defesas antioxidantes (VALKO et al., 2007).

Entretanto, quando o sistema antioxidante natural não consegue restabelecer esse equilíbrio, um quadro de estresse oxidativo pode ser formado e pode resultar em danos irreversíveis para as células (VASCONCELOS et al., 2007).

Existem fortes evidências de que o estresse oxidativo contribui para o desenvolvimento de processos de envelhecimento, transformação e morte celular, que se relacionam diretamente a muitos processos patológicos dentre eles câncer, enfermidades crônicas como doenças auto-imunes, cardiopatias (VASCONCELOS et al., 2007), aterosclerose, diabetes, Alzheimer, câncer, desordens neurológicas, envelhecimento (SALVADOR & HENRIQUES, 2004), processos inflamatórios, desordens de cicatrização, dentre outros (PESSUTO et al., 2009).

Além do sistema antioxidante natural endógeno, na natureza existe uma gama de substâncias antioxidantes que podem ser consumidas para reduzir os níveis de ERO's. Essas substâncias podem ser provenientes da dieta alimentar e de outras fontes (SOUSA et al., 2007).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato. As substâncias formadas a partir de antioxidantes não são reativas para prolongar a reação em cadeia sendo neutralizadas por reação com outra espécie reativa formando produtos estáveis ou podem ser reciclados por outro antioxidante (SOUSA et al., 2007)

Dentre as substâncias com alto poder antioxidante pode-se destacar as vitaminas e os compostos fenólicos. Algumas das vitaminas do complexo B tem sido reportadas como

potentes antioxidantes (SUZUKI, 2009). Também a vitamina C presente abundantemente em vegetais e frutos apresenta uma multiplicidade de propriedades, dentre elas o alto poder antioxidante de reciclar a vitamina E no processo de peroxidação lipídica das membranas e lipoproteínas (SOUSA et al., 2007) protegendo várias biomoléculas contra o dano causado por ERO's, além de participar nos processos de cicatrização de feridas e queimaduras, na proteção do tecido conjuntivo, sendo também estimulador do sistema imunológico (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

Os tocoferóis são provavelmente os inibidores mais importantes na reação em cadeia da peroxidação lipídica em animais (SUZUKI, 2009). A vitamina E é a designação dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica através do seqüestro de radicais peroxila (SOUSA et al., 2007). Acredita-se que, devido as suas propriedades antioxidantes, ela possa prevenir doenças associadas ao estresse oxidativo, tais como câncer, inflamação crônica e desordens neurológicas (SALVADOR & HENRIQUES, 2004).

As substâncias fenólicas são reconhecidamente detentoras de pronunciada propriedade antioxidante, atuando como seqüestradores de radicais livres e como quelante de metais (PESSUTO et al., 2009) pela formação do radical fenoxil. Pertencentes a esta grande classe de compostos orgânicos, os taninos são considerados antioxidantes superiores. A atividade farmacológica dos taninos esta relacionada com a complexação com íons metálicos, com o fato de serem seqüestradores de radicais livres e com a habilidade de complexar com outras moléculas, incluindo proteínas e polissacarídeos (SUZUKI, 2009; BLOKHINA & FAGERSTEDT, 2010). Outros polifenóis com propriedade antioxidante expressiva são os flavonóides. Sua propriedade antioxidante refere-se ao fato de serem quelantes de metais e varredores de radicais livres. Muitos são os flavonóides de conhecida e comprovada ação antioxidante. Sabe-se que uma dieta rica em flavonóides reduz o risco de vários tipos de câncer, especialmente os hormônio dependentes (SALVADOR & HENRIQUES, 2004). Diante desta importante atividade dos fenóis, cresce o interesse face a possibilidade de serem utilizados em várias doenças degenerativas, tais como envelhecimento precoce, processos inflamatórios, cicatrização, câncer entre outras (PESSUTO et al., 2009).

Além da correlação existente entre propriedade antioxidante de substâncias polares e capacidade de inibir ou retardar o aparecimento de células cancerígenas, bem como o

envelhecimento das células em geral, é importante ressaltar o interesse da aplicação de antioxidantes na indústria para proteção de cosméticos, fármacos e alimentos, prevenindo a decomposição oxidativa desses pela ação da luz, temperatura e umidade (BARREIROS et al., 2006).

1.4 Atividade Antiinflamatória e Analgésica

A inflamação é uma resposta coordenada do sistema imunológico a estímulos nocivos que aparecem durante um quadro de infecção ou após uma lesão tecidual (STUTZ et al., 2009). Ao se depararem com estes agentes infecciosos ou irritantes, causadores de danos nos tecidos, o sistema imunológico reage ativando uma variedade de células específicas responsáveis por lançar no organismo inúmeras substâncias que conduzem aos sinais clínicos comumente conhecidos de inflamação: dor, rubor, calor, tumor e perda da função (STUTZ et al., 2009).

A resposta inflamatória é o resultado da atividade de uma infinidade de mediadores químicos liberados pelas células do sistema imune (quimiocinas, citocinas, peptídeos antimicrobianos, espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, dentre outros) e da resposta bioquímica ativada “*in loco*” (ativação da cascata de coagulação, ativação de complemento, dentre outros) (STUTZ et al., 2009).

As células do sistema imune agem em conjunto com as células do tecido local com a finalidade de remover o agente infeccioso e de reparar o dano causado no tecido agredido, entretanto, sob certas condições, a resposta imune pode danificar os tecidos resultando em processos inflamatórios crônicos (STUTZ et al., 2009).

A resposta inflamatória de fase aguda apresenta dois componentes: resposta inata e resposta imunológica adaptativa. A primeira é ativada imediatamente após um quadro de lesão ou infecção e desempenha um importante papel no mecanismo de defesa. Ela inclui uma diversidade de estratégias para iniciar a resposta inflamatória tais como barreiras físicas, fagocitose, complemento, receptores que servem para prevenir a infecção, eliminar os agentes patógenos e iniciar o processo inflamatório (CRAY et al., 2009). Após o reconhecimento do patógeno pelo sistema inato, entra em ação a resposta imunológica adaptativa, que é constituída por respostas altamente específicas a este patógeno reconhecido, além de tornar mais eficiente as ações de células e mediadores da resposta inata.

A resposta imunológica adaptativa é dividida em duas fases. Na fase de indução, o patógeno é apresentado aos linfócitos, que ativado entra em expansão clonal para que novas células sejam capazes de reconhecer e eliminar o agente invasor. Já na fase efetora, as células derivadas da expansão clonal são diferenciadas em plasmócitos, que produzirão uma resposta mediada por anticorpos ou por células, e em células de memória, sensíveis a antígenos daquele invasor (BRUNTON et al., 2006).

Freqüentemente, além das alterações locais causadas pelo processo inflamatório, ocorrem manifestações sistêmicas gerais tais como febre, leucocitose e liberação de proteínas de fase aguda pelo fígado. Entretanto, algumas vezes, o desequilíbrio da resposta imunológica pode causar respostas inflamatórias e imunológicas indesejadas como reações alérgicas e hipersensibilidade (PEREIRA, 2004).

Contudo, o resultado final da resposta inflamatória é um mecanismo de defesa e possui um importante papel para restaurar a estrutura e a função normal do tecido lesionado. Desta maneira, o quadro de inflamação pode evoluir para a cura completa ou para a cicatrização, caso tenha havido lesão. Entretanto, caso o organismo não consiga eliminar o patógeno, a resposta aguda pode evoluir para um quadro de resposta inflamatória crônica, reação lenta que pode persistir indefinidamente destruindo tecidos (RANG et al., 2007).

Vários mediadores estão envolvidos na resposta inflamatória e nas reações imunológicas como responsáveis pelo aparecimento dos sinais e sintomas inflamatórios (DE FRANCISCHI, 2005). Estes mediadores são de extrema importância farmacológica uma vez que, os agentes antiinflamatórios e analgésicos agem inibindo a produção desses mediadores com a finalidade de amenizar as manifestações sintomáticas da inflamação.

Vasodilatação, recrutamento de leucócitos, estimulação da fagocitose, aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia, febre, broncoconstrição, estimulação e inibição de expressão de proteínas e de outros mediadores inflamatórios são alguns dos principais sinais e sintomas produzidos pelos mediadores da inflamação. Na pesquisa de substâncias com atividade antiinflamatória é bastante comum a utilização de modelos experimentais para avaliar estes sintomas (DE FRANCISCHI, 2005).

A hiperalgesia é denominada como estado de sensibilização de terminais nervosos sensitivos resultado do abaixamento do limiar da fibra para deflagração da resposta dolorosa. Ela pode resultar de estímulos físicos, químicos ou biológicos e os principais mediadores químicos envolvidos na hiperalgesia são as prostaglandinas (DE FRANCISCHI, 2005). Entretanto, dor e nocicepeção são conceitos distintos, uma vez que o primeiro é uma

experiência subjetiva. Desta forma, o componente nociceptivo pode ser exatamente o mesmo, mas o componente afetivo acaba sendo diferente. Testes para avaliação de atividades analgésicas em animais comumente medem a nocicepção, analisando a reação do animal a estímulo levemente doloroso, seja ele térmico, químico ou mecânico (RANG et al., 2007). Segundo Rang e colaboradores (2007) costuma haver pouca correlação entre a atividade analgésica em testes com animais e sua eficácia clínica.

As substâncias antiinflamatórias e analgésicas podem atuar inibindo a síntese e/ou liberação desses mediadores ou antagonizando a ação deles em seus receptores. Entretanto, tem se observado que as substâncias mais eficientes são as que inibem a síntese e/ou liberação dos mediadores da dor e da inflamação (DE FRANCISCHI, 2005).

Fármacos antiinflamatórios são divididos em três grupos: antiinflamatórios não-esteroidais (AINES), os glicocorticóides e os anti-reumatóides.

De forma geral, os AINES possuem ação antiinflamatória, analgésica e antipirética pelo bloqueio da produção de prostaglandinas, entretanto, muitos efeitos colaterais estão associados com estes medicamentos tais como irritação gástrica, deficiências na hemostasia e alterações renais (DE FRANCISCHI, 2005).

Os glicocorticóides são agentes mais potentes e eficazes disponíveis na terapêutica da inflamação, e como possuem ação sistêmica, além da atividade antiinflamatória, são também utilizados para reposição hormonal e como imunossupressores. Entretanto, são possuidores de muitos efeitos adversos, principalmente com administração prolongada, tais como inibição da resposta a infecções, supressão da síntese endógena de corticóides, ações metabólicas, osteoporose e síndrome de Cushing (MILLER et al., 1978; AHMADIANI et al., 1998; VELPOORTE, 1999).

Os anti-reumatóides são utilizados para o tratamento de inflamações crônicas e são capazes de, além de reduzir os sintomas, suspender ou reverter a inflamação crônica. Desta maneira, são utilizados nestas enfermidades crônicas os AINES para tratamento da crise aguda e os anti-reumatóides para tratamento da crise aguda e para profilaxia. (RANG et al., 2007).

Além dos AINES, outras substâncias possuem ação analgésica. Os opióides, cujos principais efeitos são analgesia, euforia e sedação, possuem potentes efeitos analgésicos. Entretanto, apesar de serem potentes analgésicos, possuem alguns efeitos adversos problemáticos, como depressão respiratória e constipação, além de causarem dependência física. Outras substâncias podem ser usadas para tratar estados dolorosos neuropáticos que

respondem mal a analgésicos convencionais, como antidepressivos tricíclicos, antiepilépticos, cetamina e lidocaína (BRUNTON et al., 2006).

Métodos de avaliação de atividades antiinflamatória e analgésica são de suma importância para descobrimento de novas substâncias ativas a partir de plantas medicinais, uma vez que inflamação e dor estão intimamente relacionadas, sendo observadas ao mesmo tempo, em distúrbios inflamatórios (OLIVEIRA, 2005). Desta maneira, o uso de um único medicamento para aliviar sintomas de dor, inflamação e febre é de enorme importância no tratamento de enfermidades, particularmente das doenças inflamatórias crônicas (DE FRANCISCHI, 2005).

Devido aos vários efeitos adversos dos medicamentos disponíveis no mercado e ao potencial farmacológico da flora brasileira, a busca por novas substâncias com atividades antiinflamatória e analgésica é de extrema importância para a pesquisa e o desenvolvimento de medicamentos com estas atividades.

Neste sentido, considerando que poucos estudos farmacológicos foram realizados com o gênero *Protium*, que não existem relatos de estudos químicos e farmacológicos de *Protium spruceanum* e a presença de substâncias de natureza terpênica em resinas de espécies desse gênero, as quais foram atribuídas várias atividades farmacológicas, a investigação da atividade antiinflamatória e analgésica do extrato das folhas de *Protium spruceanum* é de grande relevância para a pesquisa de produtos naturais.

2- OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente trabalho teve por objetivo geral realizar o estudo fitoquímico biomonitorado para a atividade antiinflamatória e analgésica de folhas da espécie *Protium spruceanum* (Benth.) Engler. (Burseraceae), bem como o isolamento de metabólitos secundários majoritários.

2.2 Objetivos Específicos

Como objetivos específicos, buscou-se:

- obter o extrato etanólico bruto (EEB) de folhas de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler e suas frações por meio de partições com solventes de grau crescente de polaridade;
- caracterizar fitoquimicamente a espécie *Protium spruceanum* a fim de identificar qualitativamente as classes de metabólitos secundários presentes neste extrato;
- isolar e identificar os metabólitos secundários majoritários e/ou ativos de *Protium spruceanum*;
- avaliar a atividade antiinflamatória do extrato e das frações obtidas utilizando o modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos;
- avaliar a atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção em camundongos pelos métodos de placa quente, contorções induzidas por ácido acético e formalina;
- avaliar a propriedade antioxidante do extrato e das frações utilizando DPPH como radical livre instável;
- determinar o teor de compostos fenólicos totais no EEB;
- determinar o teor de flavonóides totais no EEB e em suas frações;
- estimar a DL₅₀ (dose letal para 50% dos animais) do EEB.

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material Botânico

Folhas de *Protium spruceanum* foram coletadas em abril de 2008 em propriedade particular no Município de Lavras, Minas Gerais. Após a identificação botânica realizada pela professora Dra. Vivette Appolinário Rodrigues Cabral, a exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Federal de Lavras, sob o número 16399 HESAL.

3.2 Estudo Fitoquímico

3.2.1 Processamento do Material Vegetal e Obtenção do Extrato Etanólico Bruto (EEB) e das Frações

Folhas de *Protium spruceanum* foram mantidas em estufa a 50 °C (Nova Ética, Brasil), com ventilação até completa secagem e posteriormente trituradas em moinho de facas (MR Manesco, Brasil) até obtenção de pó.

O pó obtido (200,0 g) foi submetido à extração pelo método de percolação exaustiva com álcool etílico comercial (Topázio, Brasil) como solvente em ciclos de 24 horas, à temperatura ambiente e em percolador de vidro. O líquido foi concentrado em evaporador rotatório (Fisatom, Brasil), para eliminação parcial do solvente. O processo foi repetido por 19 vezes buscando a extração máxima até o esgotamento, quase total do material vegetal. O EEB obtido foi submetido a secagem em estufa a 30-40 °C (Fanem, Brasil) para completa eliminação do solvente e após completa secagem apresentou-se como sólido de coloração verde escuro, de massa 52,39 g. O resíduo do pó, submetido a secagem em temperatura ambiente, foi pesado, obtendo-se 143,75 g. Durante este procedimento, ocorreu perda de aproximadamente 2 % de material (3,86 g).

O processo de obtenção e fracionamento do EEB com as respectivas massas e rendimentos obtidos está representado na Figura 2.

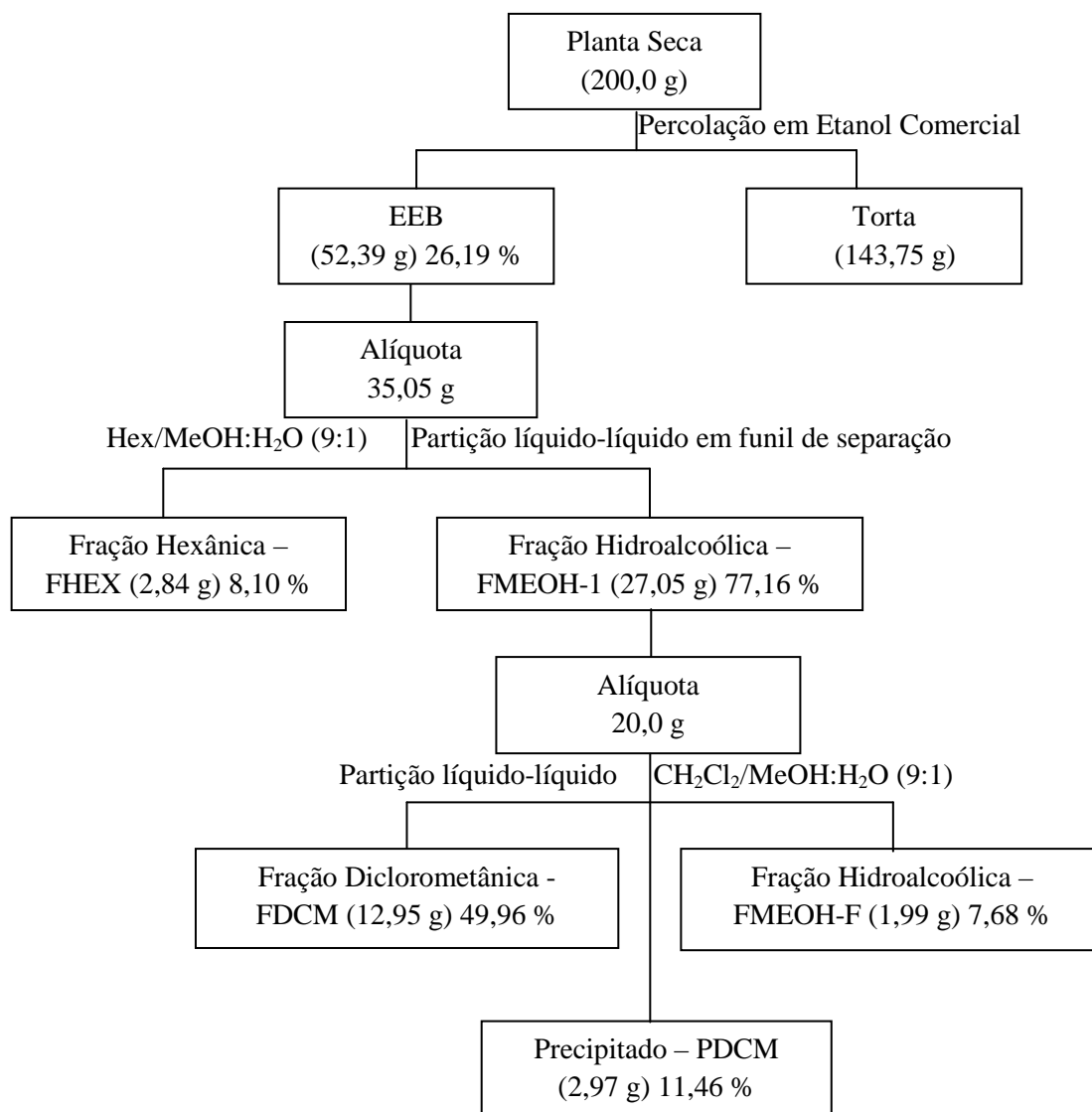


Figura 2. Esquema do processo de obtenção do extrato etanólico bruto de folhas de *Protium spruceanum* Beth. (Engler) e do seu fracionamento.

Para a obtenção das frações, o EEB (35,05 g) foi ressuspenso em MeOH:H₂O (9:1) e submetido a partição líquido-líquido em funil de separação com hexano PA (Synth, Brasil), obtendo-se uma fração hexânica (FHEX) e uma fração hidroalcoólica (FMEOH-1). As frações foram concentradas em evaporador rotatório e mantidas em estufa a 30-40 °C até completa eliminação do solvente e as massas obtidas foram respectivamente, 2,84 e 27,05 g.

Posteriormente, a fração FMEOH-1 (20,0 g) foi ressuspenso em MeOH:H₂O (9:1) e submetida a nova partição líquido-líquido em funil de separação com diclorometano PA (Synth, Brasil), obtendo-se uma fração diclorometânica (FDCM), uma fração hidroalcoólica

(FMEOH-F), e um precipitado (PDCM). As frações foram concentradas em evaporador rotatório e mantidas em estufa a 30-40 °C até completa eliminação do solvente. Após o procedimento, as massas obtidas para as frações FDCM, FMEOH-F e PDCM foram respectivamente, 12,95; 1,99 e 2,97 g.

3.2.2 Purificação das Frações e Isolamento de Substâncias

Para a purificação das frações foram utilizadas técnicas de cromatografia líquida clássica em coluna (CLC), cromatografia em camada delgada preparativa (CCDP), cromatografia de exclusão molecular (CEM).

Nas CLC's foram utilizadas colunas de vidro com placas sinterizadas, com capacidades variadas. Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60, 40-230 mesh (0,063-0,200 mm) para cromatografia em coluna (Vetec, Brasil), numa proporção não inferior a 1:30 (amostra:fase estacionária). As diversas fases móvel utilizadas para CLC foram misturas de solventes em diferentes concentrações, em ordem crescente de polaridade, sendo eles hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, metanol (Synth, Brasil) e água destilada.

As CCDP's foram realizadas utilizando-se placas cromatográficas de dimensão 10 cm x 10 cm e com espessura de 0,75 mm de sílica gel 60G F254 para cromatografia em camada fina com indicador de fluorescência UV-vis a 254 nm (Vetec, Brasil ou Merck, Alemanha) como adsorvente e como fase móvel foram utilizadas misturas de solventes orgânicos (hexano, diclorometano, clorofórmio, acetato de etila, acetona, metanol), quando necessário, saturados com solução de ácido acético glacial PA (Vetec, Brasil) em água destilada.

Nas CEM's foram utilizadas colunas de vidro com placa sinterizada com 2,5 cm de diâmetro e 60 cm de altura. A fase estacionária utilizada na CEM foi sephadex LH-20 (GE, Reino Unido) ocupando um volume de aproximadamente 200 mL e a fase móvel utilizada nas CEM's foi metanol.

Todo o processo cromatográfico foi monitorado por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC), utilizando placas cromatográficas de diferentes dimensões e com espessura de 0,25 mm de sílica gel 60G para cromatografia em camada fina com

indicador de fluorescência UV-vis a 254 nm como adsorvente, e diferentes misturas dos solventes orgânicos como fases móvel. As placas foram reveladas em luz ultravioleta, a 254 nm e em solução de vanilina puríssima (Isofar, Brasil) /ácido perclórico PA (Vetec, Brasil), como revelador universal, com posterior aquecimento a 100-150 °C em estufa (Biofar) por aproximadamente 5 minutos.

As placas cromatográficas de CCDC e CCDP foram preparadas utilizando-se a proporção de 1:2 (sílica gel:H₂O), que foram depositadas sobre placas de vidro e levadas a estufa (100-150 °C) por no mínimo 1 hora para ativação.

A solução de vanilina/ácido perclórico foi preparada utilizando-se a mistura 1:1 de solução de vanilina em etanol PA (Synth, Brasil) a 5 % e ácido perclórico em água destilada a 3 %. As soluções foram conservadas sob refrigeração.

O EEB e suas frações foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Essas análises foram realizadas em Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Waters, Módulo de Separação Alliance 2695 e Detector de Arranjo de Diodos Waters (DAD) 2696. Foram utilizados como fase móvel solventes de grau CLAE (metanol, J.T. Baker) e água ultrapura, MilliQ, filtrada em filtro de PVDF 0,2 µm (Alcrom) e deixados em ultrassom (Unique) por aproximadamente 1 hora. A fase estacionária utilizada foi pré-coluna coluna 5µ C-18 Phenomenex e coluna cromatográfica Luna C-18 (2) 100A (250 x 4,6 mm x 5 µm) Phenomenex. Os cromatogramas foram extraídos em 254 nm.

As condições cromatográficas para as análises por CLAE foram: temperatura constante a 30 °C, volume de injeção 20,0 µL, fluxo de 0,8 mL/min, tempo de eluição de 75 minutos, fase móvel metanol:água em eluição gradiente de metanol (48-100 %) de 0 a 60 minutos, mantendo-se em 100 % de metanol até 65 minutos. Até 70 minutos o gradiente retornava ao gradiente inicial se mantendo nesta proporção até 75 minutos quando nova injeção de amostra acontecia.

As análises de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio e de Carbono (RMN de ¹H e de ¹³C) foram realizadas no Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear Multi-usuário da UFMG (LAREMAR). Os espectros de RMN de ¹H e de ¹³C foram obtidos em Espectrômetros de RMN Bruker Advance DRX 400 ou DPX 200, operando a 200 MHz e 400 MHz, utilizando-se como solventes das amostras clorofórmio delterado (CDCl₃) ou metanol deuterado (MeOD) ou água deuterada (D₂O).

Os pontos de fusão foram medidos em aparelho de ponto de fusão (Büchi, M-850, Suíça).

3.2.2.1 Fração Hexânica

Para o isolamento e purificação de substâncias presentes na fração hexânica (FHEX) foram utilizadas técnicas de Cromatografia Líquida Clássica em Coluna (CLC) monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC), bem como técnicas de Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP).

Inicialmente, a FHEX foi submetida a análise por CCDC para a determinação da fase móvel e do sistema eluente mais adequado para iniciar a CLC.

Após a escolha do sistema eluente, 2,0 g da FHEX foram solubilizados em hexano e incorporados a 2,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada a temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 2,0 cm de diâmetro, foram empacotados 63,4 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh, umedecida com hexano. A pastilha foi adicionada à CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol e suas misturas. Foram coletadas 166 frações de aproximadamente 10 mL (Tabela 2). As frações de número 165 e 166 foram de aproximadamente 100 mL.

Após análise por CCDC das frações acima obtidas pelo fracionamento de FHEX, a fração reunida FH 97-135, eluída com Hex:CH₂Cl₂ (70:30 a 50:50) apresentou-se como um sólido amarelo de massa 0,3 g que foi refracionado como descrito no item 3.3.2.1.a) .

Tabela 2: Frações de FHEX obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1 – 20	Hexano	100
21 – 38	Hex:CH ₂ Cl ₂	99:1
39 – 47	Hex:CH ₂ Cl ₂	98:2
48 – 53	Hex:CH ₂ Cl ₂	97:3
54 – 62	Hex:CH ₂ Cl ₂	95:5
63 – 72	Hex:CH ₂ Cl ₂	90:10
73 – 100	Hex:CH ₂ Cl ₂	70:30
101 – 121	Hex:CH ₂ Cl ₂	60:40
122 – 147	Hex:CH ₂ Cl ₂	50:50
148 – 161	Hex:CH ₂ Cl ₂	25:75
162 – 164	CH ₂ Cl ₂	100
165	AcOEt	100
166	MeOH	100

3.2.2.1.a) Fração Reunida FH 97-135

A fração reunida FH 97-135 (0,3 g) foi solubilizada em hexano e incorporada a 0,3 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada a temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 0,5 cm de diâmetro, foram empacotados aproximadamente 10,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh umedecida com hexano. A pastilha foi adicionada à CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol e suas misturas. Foram coletadas 33 frações de aproximadamente 10 mL (Tabela 3). As frações de número 28 a 33 foram de aproximadamente 50 mL.

Após análise por CCDC das frações e reunião das que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, a fração 7-9 apresentou-se como um sólido cristalino branco com traços amarelos que após o processo de cristalização em diclorometano, foi denominado IH1, com massa 16,95 mg, completamente branco. Este sólido, apresentou-se com mancha única em CCDC, visualizada em luz UV-vis a 254 nm, e após utilização de

solução de vanilina/ácido perclórico e aquecimento durante 5 minutos a 100 °C, apresentou mancha única com borda lilás e interior rosa.

A faixa de fusão para IH1 foi de 176,5-177,5 °C obtida em aparelho capilar.

Essa amostra foi submetida a análise de RMN ^1H e ^{13}C para elucidação estrutural.

Tabela 3: Frações de FH 97-135 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1	Hexano	100%
2 – 3	Hex:CH ₂ Cl ₂	80:20
4 – 6	Hex:CH ₂ Cl ₂	75:25
7 – 9	Hex:CH ₂ Cl ₂	70:30
10 – 11	Hex:CH ₂ Cl ₂	65:35
12 – 13	Hex:CH ₂ Cl ₂	60:40
14 – 15	Hex:CH ₂ Cl ₂	55:45
16 – 17	Hex:CH ₂ Cl ₂	50:50
18 – 19	Hex:CH ₂ Cl ₂	30:70
20 – 22	CH ₂ Cl ₂	100
23 – 25	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	80:20
26 – 27	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	50:50
28 – 29	AcOEt	100
30 – 33	MeOH	100

3.2.2.1.a.i Fração Reunida FH 97-135/6-9

Após a filtração, o sobrenadante da fração FH 97-135/7-9 foi reunido com a fração FH97-135/6 pois ainda apresentava sólido branco com traços amarelos e perfil cromatográfico semelhante. A fração FH 97-135/6-9 (0,084 g) foi novamente submetida a CLC, sendo solubilizada em hexano e incorporada a 0,08 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada a temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 0,5 cm de diâmetro, foram empacotados aproximadamente 3,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh umedecida com hexano. A pastilha foi adicionada à CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes

hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Foram coletadas 76 frações. Na primeira fração foram coletados 2,5 mL, das frações 2 a 10 foram coletados aproximadamente 10 mL. Após a fração 11, foram coletadas frações de aproximadamente 5 mL (Tabela 4).

Tabela 4: Frações de FH 97-135/6-9 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1	Hexano	100%
2 – 6	Hex:CH ₂ Cl ₂	80:20
7 – 12	Hex:CH ₂ Cl ₂	77:23
13 – 17	Hex:CH ₂ Cl ₂	75:25
18 – 22	Hex:CH ₂ Cl ₂	70:30
23 – 26	Hex:CH ₂ Cl ₂	67:33
27 – 30	Hex:CH ₂ Cl ₂	65:35
31 – 34	Hex:CH ₂ Cl ₂	63:37
35 – 38	Hex:CH ₂ Cl ₂	60:40
39 – 42	Hex:CH ₂ Cl ₂	55:45
43 – 46	Hex:CH ₂ Cl ₂	50:50
47 – 50	Hex:CH ₂ Cl ₂	45:55
51 – 53	Hex:CH ₂ Cl ₂	40:60
54 – 55	Hex:CH ₂ Cl ₂	20:80
56 – 57	CH ₂ Cl ₂	100
58 – 60	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	80:20
61 – 62	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	60:40
63 – 65	AcOEt	40:60
66 – 67	MeOH	20:80
68 – 69	AcOEt	100
70 – 73	AcOEt:MeOH	50:50
74 – 76	MeOH	100

Após análise por CCDC das frações e reunião das que apresentaram perfil semelhante, a fração reunida 11-18 apresentou-se como um sólido cristalino branco e após o processo de cristalização em diclorometano, foi denominado IH2, com massa 67,18 mg, completamente branco. Este sólido, apresentou-se com mancha única em CCDC, visualizada em luz UV-vis a 254 nm, e após utilização de solução de vanilina/ácido perclórico e

aquecimento durante 5 minutos a 100 °C, apresentou mancha única com borda lilás e interior rosa.

A faixa de fusão, observada em aparelho capilar para o sólido IH2 foi 176,0-177,5 °C, mesma faixa de fusão do sólido IH1.

Essa amostra foi reunida à amostra IH1, obtendo-se uma massa total de 84,13 mg.

3.2.2.2 Fração Diclorometânica

Para o isolamento e purificação de substâncias presentes na FDCM foram utilizadas técnicas de Cromatografia Líquida Clássica em Coluna (CLC), Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Inicialmente, a FDCM foi submetida a análise por CCDC para a escolha da fase móvel e para determinação da proporção do sistema eluente mais adequado para iniciar a CLC.

Após a escolha do sistema eluente, 5,0 g da FDCM foram solubilizados em mistura CH_2Cl_2 :AcOEt e incorporados a 5,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada a temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 2,0 cm de diâmetro, foram empacotados aproximadamente 120,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh umedecida com hexano. A pastilha foi adicionada à CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e suas misturas. Foram coletadas 90 frações de aproximadamente 10 mL conforme representado na Tabela 5.

Após análise por CCDC das frações obtidas pelo fracionamento de FDCM e da reunião das que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, a fração reunida FDCM 50-60, de massa 0,66 g, apresentou-se semi-purificada e foi submetida ao refracionamento.

Tabela 5: Frações de FDCM obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1 – 4	Hexano	100%
5 – 8	Hex:CH ₂ Cl ₂	95:5
9 – 12	Hex:CH ₂ Cl ₂	85:15
13 – 17	Hex:CH ₂ Cl ₂	75:25
18 – 25	Hex:CH ₂ Cl ₂	50:50
26 – 33	Hex:CH ₂ Cl ₂	25:75
34 – 40	CH ₂ Cl ₂	100
41 – 58	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	50:50
59 – 64	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt	25:75
65 – 69	AcOEt	100

3.2.2.2.a) Fração FDCM 50-60

A fração reunida FDCM 50-60 (0,66 g) foi solubilizada em metanol e incorporada a 0,6 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada em estufa a 40 °C para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 1,0 cm de diâmetro, foram empacotados aproximadamente 30,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh umedecida com acetato de etila. A pastilha completamente seca foi adicionada à CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes acetato de etila e metanol. Foram coletadas 79 frações de aproximadamente 10 mL conforme representado na Tabela 6.

Após a análise por CCDC das frações coletadas e reunião daquelas com perfil cromatográfico semelhante, a fração FDCM 50-60/17-26 apresentou um perfil cromatográfico melhor definido, de massa 0,04 g, e foi refractionada em CEM utilizando-se Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol como fase móvel.

Também a fração reunida FDCM 50-60/32-36 apresentou um perfil cromatográfico interessante em CCDC e foi refractionada em CEM, nas mesmas condições descritas acima.

Tabela 6: Frações de FDCM 50-60 obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1 – 6	AcOEt	100%
7 – 12	AcOEt: MeOH	95:5
13 – 18	AcOEt: MeOH	90:10
19 – 24	AcOEt: MeOH	85:15
25 – 30	AcOEt: MeOH	80:20
31 – 38	AcOEt: MeOH	75:25
39 – 42	AcOEt: MeOH	70:30
43 – 46	AcOEt: MeOH	60:40
47 – 53	AcOEt: MeOH	50:50
54 – 58	AcOEt: MeOH	40:60
59 – 63	AcOEt: MeOH	30:70
64 – 68	AcOEt: MeOH	20:80
69 – 73	AcOEt: MeOH	10:90
74 – 79	MeOH	100

3.2.2.2.a.i Fração FH 50-60/17-26

Aproximadamente 50 g de Sephadex LH-20 foram submersas em metanol por 24 horas. Após este período, lentamente foram empacotadas em coluna de vidro, de 2,5 cm de diâmetro. A altura ocupada pela fase estacionária foi 42 cm, perfazendo um volume de aproximadamente 200 cm³. A fração reunida FDCM 50-60/17-26 (0,04 g) foi solubilizada em 2,0 mL de metanol e adicionada a coluna. Foram coletadas 23 frações de aproximadamente 10 mL utilizando-se metanol como fase móvel e até completa eliminação da amostra da coluna.

A 11^a e 12^a frações foram submetidas a CCDP para isolamento da substância amarela nas placas e denominadas ID3 (1,7 mg) e ID2 (4,0 mg) respectivamente. Estas amostras foram submetidas a análise de RMN para elucidação estrutural.

3.2.2.2.a.ii. Fração FDCM 50-60/32-36

Aproximadamente 50 g de Sephadex LH-20 foram submersas em metanol por 24 horas. Após este período, lentamente foram empacotadas em coluna de vidro, de 2,5 cm de diâmetro. A altura ocupada pela fase estacionária foi 40 cm, perfazendo um volume de aproximadamente 200 cm³. A fração reunida FDCM 50-60/32-36 (0,16 g) foi solubilizada em 2,5 mL de metanol e adicionada a coluna. Foram coletadas 21 frações. A 1^a fração de 60 mL, as frações de 2 a 6 de 20 mL e as frações de 7-20 de 10 mL e a fração 21 de 20 mL. Estes volumes correspondem a volumes aproximados. A fase móvel utilizada foi metanol até completa eliminação da amostra da coluna.

Todas as frações foram submetidas a CCDC para análise do perfil cromatográfico e as frações 10 a 12 foram reunidas em uma única fração. Esta fração reunida foi submetida a CCDC para isolamento da macha amarela bem resolvida. Após a CCDC, a amostra (7,5 mg) foi denominada ID4 e submetida a análise de RMN para elucidação estrutural.

3.2.2.3 Precipitado da Partição MeOH:H₂O/CH₂Cl₂

Para o isolamento e purificação de substâncias presentes no precipitado da partição MeOH:H₂O/CH₂Cl₂ (PDCM) foram utilizadas técnicas de Cromatografia Líquida de Média Pressão (CLMP), Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Para a realização da CLMP, foi utilizado o Cromatógrafo de Média Pressão do Laboratório de Pesquisa do Núcleo de Estudo de Plantas Medicinais da UFMG (NEPLAM/UFMG). Inicialmente, a PDCM foi submetida a CLMP, tendo sido injetado na coluna do aparelho aproximadamente 3,0 mL de uma solução 30 mg/mL. O procedimento foi realizado por 3 vezes e foram coletadas 6 frações.

A fração 4, denominada MPLC-4, coletada como pico único no CLMP, apresentou-se na CCDC como uma mancha única, de coloração marrom quando revelada em solução vanilina/ácido perclórico e aquecimento, embora deixando um rastro, provavelmente devido a concentração.

A amostra MPLC-4 foi submetida a CEM.

3.2.2.3.a) MPLC-4

Aproximadamente 50 g de Sephadex LH-20 foram deixadas submersas em metanol por 24 horas. Após este período, lentamente foram empacotadas em coluna de vidro, de 2,5 cm de diâmetro. A altura ocupada pela fase estacionária foi 45 cm, perfazendo um volume de aproximadamente 220 cm³. A fração MPLC-4 (0,058 g) foi solubilizada em 3,0 mL de metanol e adicionada a coluna. Foram coletadas 9 frações de aproximadamente 10 mL utilizando-se metanol como fase móvel, até completa eliminação da amostra da coluna.

As 7^a e 8^a frações foram reunidas e a fração reunida foi submetida a CCDP para isolamento da substância fluorescente em luz UV-vis a 254 nm e após o isolamento foi denominada ID1 (10,5 mg). A amostra foi submetida a análise de RMN para elucidação estrutural.

3.2.2.4 Fração Metanólica Final (FMEOH-F)

Para o isolamento e purificação de substâncias presentes na Fração Metanólica Final (FMEOH-F) foram utilizadas técnicas de Cromatografia Líquida Clássica em Coluna (CLC), Cromatografia de Exclusão Molecular (CEM) e Cromatografia em Camada Delgada Preparativa (CCDP) monitoradas por Cromatografia em Camada Delgada Comparativa (CCDC).

Inicialmente, a FMEOH-F foi submetida a análise por CCDC para a escolha da fase móvel e para determinação da proporção do sistema eluente mais adequado para iniciar a CLC.

Após a escolha do sistema eluente, 0,5 g da FMEOH-F foram solubilizados em mistura AcOEt:MeOH e incorporados a 0,5 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh para confecção da pastilha para a CLC. A mistura foi deixada a temperatura ambiente para a completa evaporação do solvente.

Em coluna de vidro, de 1,0 cm de diâmetro, foram empacotados aproximadamente 30,0 g de Sílica Gel 60, 40-230 mesh umedecida com hexano. A pastilha foi adicionada à

CLC e a coluna foi eluída com gradiente crescente de polaridade utilizando-se os solventes hexano, acetato de etila, metanol e suas misturas. Foram coletadas 51 frações de aproximadamente 20 mL (Tabela 7).

Tabela 7: Frações de FMEOH-F obtidas por cromatografia em coluna utilizando gradiente de polaridade

Frações	Eluente	Proporção (%)
1 – 9	Hex: AcOEt	10:90
10 – 14	Hex: AcOEt	7:93
15 – 18	Hex: AcOEt	5:95
19 – 22	AcOEt	100
23 – 32	AcOEt:MeOH	95:5
33 – 38	AcOEt:MeOH	90:10
39 – 44	AcOEt:MeOH	80:20
45 – 50	AcOEt:MeOH	50:50
51	MeOH	100

Após análise por CCDC das frações e reunião das que apresentaram perfil cromatográfico semelhante, a fração FMEOH-F 15-25, apresentou-se semi-purificada e foi submetida ao refractionamento.

3.2.2.4.a) FMEOH-F 15-25

Aproximadamente 50 g de Sephadex LH-20 foram deixadas submersas em metanol por 24 horas. Após este período, lentamente foram empacotadas em coluna de vidro, de 2,5 cm de diâmetro. A altura ocupada pela fase estacionária foi 40 cm, perfazendo um volume de aproximadamente 200 cm³. A fração reunida FMEOH-F 15-25 (0,15 g) foi solubilizada em 2,5 mL de metanol e adicionada a coluna. Foram coletadas 22 frações de aproximadamente 20 mL. A fase móvel utilizada foi metanol até completa eliminação da amostra da coluna.

Todas as frações foram submetidas a CCDC para análise do perfil cromatográfico e as frações 17 a 19 apresentaram perfil cromatográfico semelhante e foram reunidas em uma única fração. Esta fração reunida (11,41 mg) foi submetida a CCDP para isolamento da

macha amarela bem resolvida. Após a CCDP, a amostra (6,5 mg) foi denominada MI4 e submetida a análise de RMN para elucidação estrutural.

3.2.3 Prospecção Fitoquímica

O extrato etanólico bruto foi submetido à prospecção fitoquímica para detecção qualitativa de fenóis, taninos, triterpenos, flavonóides, xantonas, cumarinas e alcalóides (MATOS, 1988). Para tal, o EEB foi ressuscitado em MeOH:H₂O (9:1) e submetido a partição em funil de separação com clorofórmio obtendo-se uma fase hidroalcoólica, rica em compostos polares e uma fase orgânica (clorofórmica), rica em compostos lipofílicos. A fração hidroalcoólica, após eliminação do solvente em evaporador rotatório, foi utilizada para a pesquisa de compostos fenólicos, flavonóides, xantonas, taninos, saponinas, alcalóides e terpenos. E na fração clorofórmica, após eliminação do solvente em evaporador rotatório, foi pesquisada a presença de esteróides.

3.2.3.1 Compostos Fenólicos

A presença de compostos fenólicos gerais foi pesquisada pela reação com cloreto férrico (FeCl₃) a 2 %. Placas de CCDC foram eluídas em solução de AcOEt:formol:H₂O (88:6:6) (WAGNER & BLADT, 1996) como fase móvel, posteriormente, observadas em luz ultravioleta, em 254 e 365 nm. Às placas, foi borrifada solução de FeCl₃ a 2 %. A reação positiva foi considerada quando ocorreu o desenvolvimento de coloração azul ou verde-azulada.

3.2.3.2 Flavonóides e Xantonas

A presença de flavonóides foi pesquisada pela reação de Shinoda. Uma alíquota da fração hidroalcoólica foi acidificada e a ela foi adicionada um pequeno fragmento de magnésio (Mg⁰).

A reação positiva foi considerada pelo desenvolvimento de coloração avermelhada, atribuída a presença de derivados flavônicos, ou azulada, pela presença de derivados antocianicos.

3.2.3.3 Taninos

A presença de taninos foi pesquisada pela reação com FeCl_3 a 2 %. O desenvolvimento de fluorescência foi considerada reação positiva para taninos.

A presença de taninos hidrolisáveis foi pesquisada adicionando a uma alíquota da fração hidroalcoólica ácido clorídrico (HCl) a 2,5 %. Após 30 minutos de incubação, foi adicionado acetato de chumbo. A reação positiva foi considerada pelo desenvolvimento de precipitado.

3.2.3.4 Saponinas

A presença de saponinas foi pesquisada pelo teste de espuma. Foi preparada uma solução estoque de 10 mg/mL e a partir desta solução foram feitas diluições de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 e 10 mg/mL, em tubos de ensaio. Posteriormente, as amostras foram submetidas a agitação vigorosa por 60 segundos. Após 15 minutos as amostras foram observadas. A reação positiva foi considerada quando algum dos tubos apresentou 1 cm ou mais de espuma, estável, após 15 minutos de repouso.

3.2.3.5 Terpenos e Esteróides

A presença de terpenos foi pesquisada na fração hidroalcoólica e a presença de esteróides, na fração clorofórmica.

A reação de Lieberman-Bouchard foi utilizada para pesquisa destes metabólitos secundários. A reação positiva foi considerada pelo desenvolvimento de coloração rósea a avermelhada, atribuída a presença de terpenos ou esverdeada pela presença de esteróides.

3.2.3.6 Alcalóides

A presença de alcalóides foi pesquisada pela extração ácido base da fração hidroalcoólica, seguindo-se de reações de precipitação (Dragendorff, Mayer, Bouchardat e Bertrand).

3.2.4 Determinação do Teor de Fenóis Totais

A Determinação do Teor de Fenóis Totais no EEB foi obtida pelo Método de Quantificação Espectrométrica de Compostos Fenólicos utilizando o Reagente de Folin-Ciocauteu, descrito por Bonoli e colaboradores (2004), com modificações (BONOLI et al., 2004).

Primeiramente foi preparada uma solução estoque de EEB (SE) na concentração de 2,5 mg/mL de EEB em metanol. Alíquotas de 400 µL de SE foram transferidas para tubos de ensaio e a elas foram adicionados 250 µL de Reagente de Folin-Ciocauteu (Cromoline, Brasil) e 3 mL de água destilada, sob agitação por 1 minuto. Após 1 minuto, foi adicionado 1 mL de solução de Na₂CO₃ (Vetec, Brasil) a 15 % sob agitação por 30 segundos. O volume foi ajustado para 5 mL com água destilada, de modo que a concentração final do EEB nas amostras foi de 200 µg/mL.

Posteriormente, foi preparada uma solução estoque de ácido gálico (Vetec, Brasil) a 2,5 mg/mL em metanol. Alíquotas de 20, 50, 100, 150, 200, 300, 400, 500, 600 e 700 µL desta solução foram pipetadas com o auxílio de pipetas automáticas (High Tech Lab, Polônia/Cyan) e o mesmo procedimento para o EEB foi realizado, de modo a obter concentrações de 10, 25, 50, 75, 100, 150, 200, 250, 300 e 350 µg/mL de ácido gálico.

Após 2 horas, a absorbância das amostras foram medidas em Espectrofotômetro de UV-vis Helios α Thermo Electron Corporation a 750 nm, em triplicata. O metanol foi utilizado para zerar o aparelho.

Com os resultados obtidos para o padrão (ácido gálico), foi construída uma curva de calibração e o teor de fenóis totais (FT) foi determinado pela interpolação da absorbância das amostras contra esta curva e foram expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

3.2.5 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

A Determinação do Teor de Flavonóides Totais (FVT) no EEB foi obtida pelo Método Colorimétrico do Cloreto de Alumínio (AlCl_3), descrito por Chag e colaboradores (2002), com modificações (CHANG et al., 2002).

Primeiramente foram preparadas soluções estoque (SE) de EEB e das frações FMEOH-1, FMEOH-F, FDCM e PDCM na concentração de 25 mg/mL de etanol 95 %. Alíquotas de 1000 μL das SE foram transferidas para tubos de ensaio e a elas foram adicionados 1000 μL de etanol 95 %, 100 μL de cloreto de alumínio hexahidratado a 10 % (Vetec, Brasil), 100 μL de acetato de potássio (Vetec, Brasil) 1 mol/L (CH_3COOK) e o volume foi ajustado para 5 mL adicionando-se 2800 μL de água destilada, de modo que a concentração final nas amostras foi 5 mg/mL.

O mesmo procedimento, sem a adição de AlCl_3 foi realizado para verificar a influência da absorvância dos extratos nas amostras (branco).

Posteriormente, foi preparada duas solução estoque de padrões de flavonóides rutina e quercetina a 1,0 mg/mL em etanol 95 %. Alíquotas de 10, 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 225 e 250 μL desta solução foram pipetadas e o mesmo procedimento para as amostras foi realizado, de modo a obter concentrações de 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50 $\mu\text{g/mL}$ de rutina, bem como de quercetina.

As amostras foram incubadas em temperatura ambiente e após 40 minutos, a absorvância das amostras foram medidas em Espectrofotômetro de UV-vis Helios α Thermo Electron Corporation a 415 nm, em triplicata. Água destilada foi utilizada para zerar o aparelho.

A absorvância de FVT nas amostras foi dada pela variação da absorvância com AlCl_3 (teste) e sem AlCl_3 (branco).

Com os resultados obtidos para os padrões de rutina e quercetina, foram construídas as curvas de calibração e o teor de FVT foi determinado pela interpolação da absorvância das amostras contra estas curvas e foram expressos em mg de ER (equivalentes de rutina) por grama de extrato e em mg de EQ (equivalentes de quercetina) por grama de extrato.

3.2.6 Determinação da Propriedade Antioxidante

A propriedade antioxidante do EEB e das frações foi determinada utilizando-se 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) como radical instável segundo a metodologia de Blois (1958) com modificações (BLOIS, 1958).

Foram preparadas soluções estoque (SE) de EEB, das frações e de ácido gálico como padrão nas concentrações de 0,2 mg/mL e 1,0 mg/mL. Da primeira SE foram pipetados 60, 120, 180, 240, 300 e 360 µL; da segunda SE foram pipetados 96, 120, 240 e 360 µL. Foi preparada uma SE de DPPH (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,004% m/v em etanol. As alíquotas das amostras, foram adicionados 2000 µL da SE de DPPH e o volume final foi ajustado para 2400 µL, de modo que as concentrações finais do EEB e das frações foram 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50, 100 e 150 µg/mL.

A absorvância do radical livre (0 % de propriedade antioxidante) foi medida utilizando-se uma alíquota de 2000 µL da SE de DPPH e o volume final foi ajustado para 2400 µL.

As amostras foram mantidas à temperatura ambiente e ao abrigo de luz.

Após 30 minutos, as leituras, em triplicata, foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS Helios α Thermo Electron Corporation a 517 nm. A capacidade de seqüestrar radicais livres (percentual de propriedade antioxidante) foi calculada com base na média do decréscimo da absorvância observada, conforme a fórmula:

$$\% \text{ AA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{Amostra}}) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Onde % AA corresponde ao percentual de propriedade antioxidante (capacidade de seqüestrar íons do radical livre DPPH); A_{DPPH} corresponde à absorvância em 517 nm da solução de DPPH após 30 minutos de incubação e A_{Amostra} corresponde à absorvância em 517 nm das amostras após 30 minutos de incubação.

O valor de CE_{50} (concentração em µg/mL requerida para 50 % de propriedade antioxidante) foi calculado por regressão linear.

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se o teste de Kruskal-Wallis seguidos do teste de comparações múltiplas de Dunn's e comparados a propriedade antioxidante de ácido gálico.

3.3 Animais Experimentais

Para os experimentos *in vivo* foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, machos, adultos, pesando de 25 a 30 g, fornecidos pelo Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto.

Os animais foram divididos em grupos de 6 indivíduos e mantidos em caixas grandes, à temperatura ambiente de 22 °C a 24 °C e em ciclos claro escuro de 12 horas, sendo tratados com ração (Sofil, Brasil) e água *ad libitum*. Os animais foram submetidos a jejum de sólidos durante 12 horas antes dos experimentos e ambientalizados no local de experimentação por aproximadamente 30 minutos antes do início dos testes.

Os protocolos experimentais utilizados foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais, sob o número 2010/07.

3.4 Experimentos “*in vivo*”

Para realização dos experimentos *in vivo* de atividade antiedematogênica e analgésica os animais foram divididos em grupos de 6 indivíduos.

O EEB e as frações FMEOH-1, FHEX, FDCM, PDCM, FMEOH-F foram solubilizadas em Tween 80 (Synth, Brasil) a 5 %, em solução fisiológica (Farmax, Brasil) e administradas, via oral (v.o.), nas doses de 100, 150, 200, 300 e/ou 400 mg/kg. Para cada método realizado, ao grupo controle foi administrado, v.o., o veículo utilizado para solubilizar as amostras (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica).

A solução fisiológica foi utilizada para que não ocorresse o desequilíbrio osmótico celular.

Para a avaliação da atividade antiedematogênica foi utilizado como fármaco padrão indometacina (Sigma-Aldrich, EUA) administrada na dose de 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal.

Para a avaliação da atividade analgésica foram utilizados como fármacos padrão dipirona (Medley, Brasil) administrada na dose de 200 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal e/ou morfina (Sigma-Aldrich, EUA) administrada na dose de 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal e/ou indometacina (Sigma-Aldrich, EUA) administrada na dose de 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal.

A atividade antiedematogênica foi avaliada utilizando-se o método de edema de pata induzido por carragenina, descrito por WINTER et al. (1962).

A atividade antinociceptiva foi avaliada utilizando-se o método de placa quente (EDDY & LEIMBACH, 1953); o método de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER et al., 1959) e o método de formalina descrito por Dubuisson & Dennis (1977) com modificações.

Para avaliar a toxicidade aguda do EEB das folhas de *Protium spruceanum* e estimar a DL₅₀, os animais foram divididos em grupos de 6 indivíduos e após jejum de sólidos de 12 horas foram administrados, v.o., as doses de 200, 300, 400, 500, 1000, 3000 e 6000 mg/kg. Os animais foram observados qualitativamente em um período de 48 horas quanto aos sinais de toxicidade como convulsão, diarreia, estado de alerta, piloereção, sedação, ptose palpebral, micção, atividade motora espontânea e morte (LITCHFIELD & WILCOXON, 1949).

3.4.1 Avaliação da Atividade Antiedematogênica

Após 30 minutos da administração do EEB, das frações, do veículo e do fármaco padrão, cada animal recebeu 0,02 mL (20 µL) de solução de carragenina (Sigma-Aldrich, EUA) a 0,1 %, via subcutânea (v.sc.), na pata direita posterior. A pata esquerda posterior foi submetida apenas a introdução da agulha (sham ou controle fictício) sem injeção de agente causador de inflamação (ACEVEDO-BOGADO, et. al, 2002; LEE & JEONG, 2002; GUZZO et. al.; 2008).

Cada animal teve a espessura entre as faces dorsal e ventral das patas posteriores direita e esquerda mensuradas utilizando-se paquímetro eletrônico digital marca Starret (GUZZO, 2007) antes do tratamento e a cada hora até a quinta hora após a administração de carragenina.

O edema foi expresso em milímetros (mm) e calculado como a variação percentual entre os tempos de análise em relação ao tempo zero. A redução significativa na variação percentual comparado ao grupo controle (tratado com veículo), foi considerada resposta antiinflamatória positiva.

3.4.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

3.4.2.1 Método de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Após 30 minutos da administração do EEB, das frações, do veículo e do fármaco padrão, cada animal recebeu via intraperitoneal (v. ip.), 0,2 mL de solução de ácido acético (Vetec, Brasil) a 0,6 % como agente nociceptivo e foi colocado sob funil de vidro em superfície lisa. As contorções abdominais foram contadas em períodos de 5 minutos, durante 25 minutos, tendo início imediatamente após a administração do ácido acético a 0,6 %.

A redução significativa no número de contorções comparado ao grupo controle (tratado com veículo), foi considerada resposta antinociceptiva positiva.

3.4.2.2 Método de Placa Quente

Cada animal foi colocado individualmente sobre placa aquecida (Corning) a $56\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ e o tempo necessário para que os animais manifestassem o reflexo de lambear, pular, sapatear ou se manter sobre uma das patas posteriores (tempo de latência para o efeito nociceptivo – TL) foi cronometrado antes (tempo 0) e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das amostras. O tempo máximo de permanência dos animais sobre a placa foi 30 segundos para evitar danos teciduais nas patas dos animais.

O aumento estatisticamente significativo do TL comparado ao TL inicial foi considerado resposta antinociceptiva positiva.

3.4.2.3 Método de Formalina

Após 30 minutos da administração do EEB e das frações (150 mg/Kg, v.o., 0,2 mL/animal), do veículo e do fármaco padrão, cada animal recebeu v.sc., 30 µL de solução de formalina a 1,5 % (ácido fórmico, Vetec, Brasil) como agente nociceptivo na pata direita posterior e foi colocado sob funil de vidro em superfície lisa. O tempo de irritação da pata direita posterior do animal, manifestado pelo ato de lamber, morder ou agitar a pata, foi cronometrado nos tempos 0 a 5 minutos, considerada fase neurogênica (Fase I) e de 20 a 25 minutos, considerada fase inflamatória (Fase II) (DUBUISSON & DENNIS, 1977).

A redução significativa do tempo de irritação da pata direita posterior comparado ao grupo controle (tratado com veículo) foi considerada como resposta antinociceptiva positiva.

3.5 Análise Estatística

Os resultados obtidos para os experimentos *in vivo* foram analisados utilizando-se análise de variância (ANOVA) seguidos do teste de comparações múltiplas de Bonferroni.

4- RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Estudo Químico

4.1.1 Fracionamento e Purificação dos Metabólitos de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.

4.1.1.1 Análises de CLAE do Extrato e das Frações de *Protium spruceanum* por CLAE

Na Figura 3 estão representados os cromatogramas obtidos através da análise por CLAE do EEB de *Protium spruceanum* e de suas frações.

As análises por CLAE representam apenas o perfil cromatográfico qualitativo do EEB e das frações deste extrato para a espécie. Entretanto, pouco se pode concluir com os resultados obtidos.

O cromatograma obtido para o EEB (Figura 3-A) foi observado que o extrato obtido das folhas de *Protium spruceanum* parece pouco complexo.

As amostras foram injetadas na concentração de 8 mg/mL, sob as mesmas condições cromatográficas e os cromatogramas foram obtidos com absorvância a 254 nm. No cromatograma de EEB (Figura 3-A) não foi possível observar sinais em tempos de retenção (T_R) superiores a 40 minutos, correspondentes aos componentes de menor polaridade presentes neste extrato, concentrados na fração FHEX (Figura 3-E). Esses resultados sugerem que o EEB apresenta quantitativamente mais compostos de maior polaridade e menos compostos de menor polaridade. Resultado semelhante foi obtido no rendimento do fracionamento, quando foi possível observar rendimento de 77,16 e 8,10 % para as frações FMEOH-1 e FHEX, respectivamente.

A presença de vários sinais no cromatograma da fração FHEX (Figura 3-E) sugere maior complexidade para esta fração, comparado aos cromatogramas das frações PDCM, FDCM e FMEOH-F (Figuras 3-B, 3-C e 3-D).

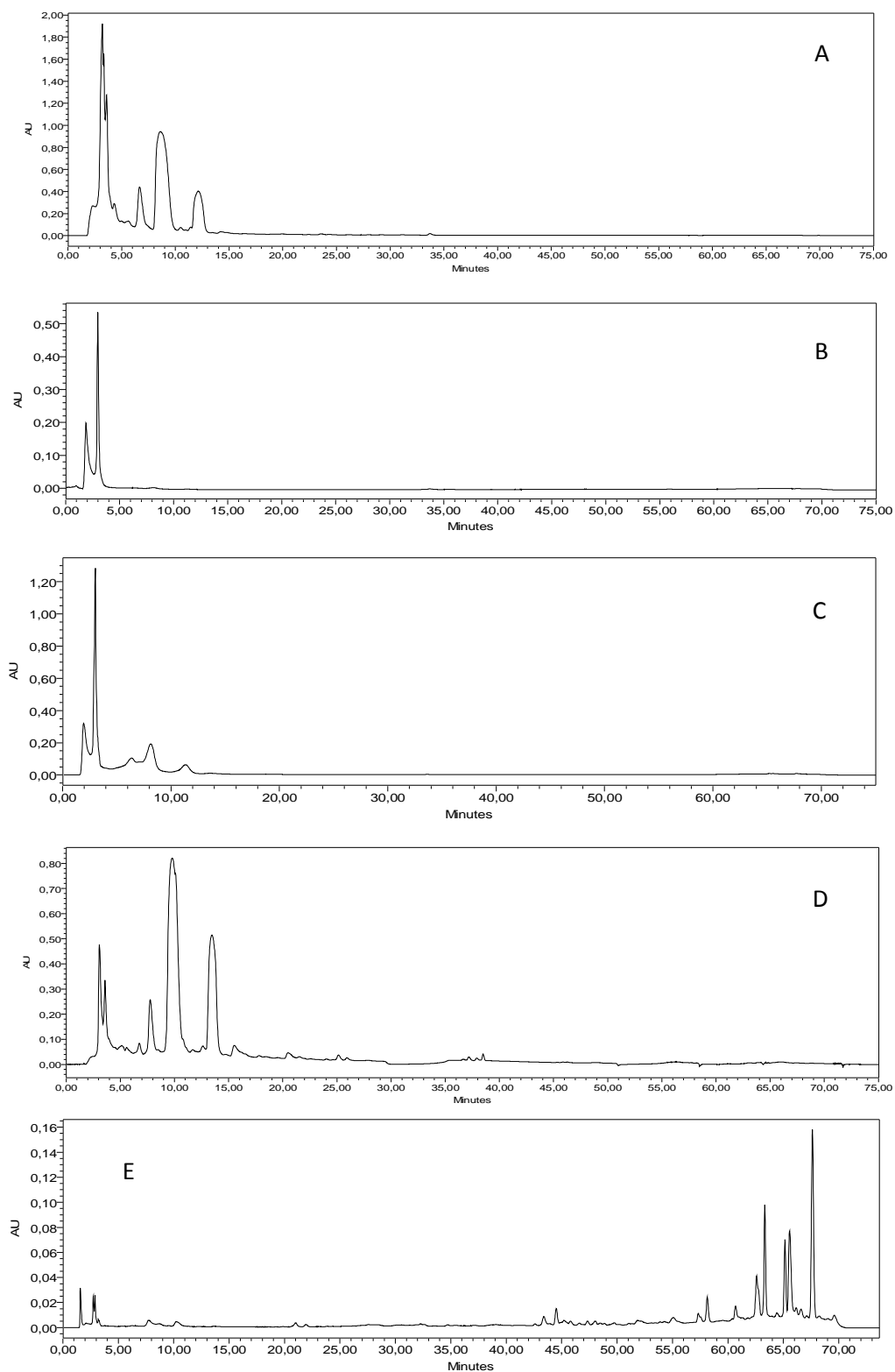


Figura 3: Análises do perfil cromatográfico por CLAE do extrato e das frações de *Protium spruceanum*. A - EEB, B - PDCM, C - FDCM, D - FMEOH-F e E - FHEx. Coluna cromatográfica Luna C-18 (2) 100A (250 x 4,6 mm x 5 µm) Phenomenex. Injeção de 20 µL de solução a 8,0 mg/mL. Fase móvel a 0,8 mL/min, MeOH:H₂O 48 %-100 % em 75 min. Absorbância a 254 nm.

4.1.1.2 Substância IH1/IH2 isolada de FHEX

A substância isolada foi identificada por meio da análise dos dados obtidos dos espectros de RMN de ^1H e ^{13}C e por comparação com dados publicados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994). Com base nesses resultados, foi possível identificar a estrutura da molécula obtida como sendo a mistura de α e β -amirinas (Figura 4).

A α -amirina é um triterpeno que possui o esqueleto básico tipo ursano. Já a β -amirina, isômero da α , possui o esqueleto básico do tipo oleano. A única diferença entre a estrutura dessas duas substâncias é a posição de um grupamento metila no anel E (SOLDI et al., 2008). Esta diferença entre as duas estruturas, dificulta o isolamento dos constituintes da mistura.

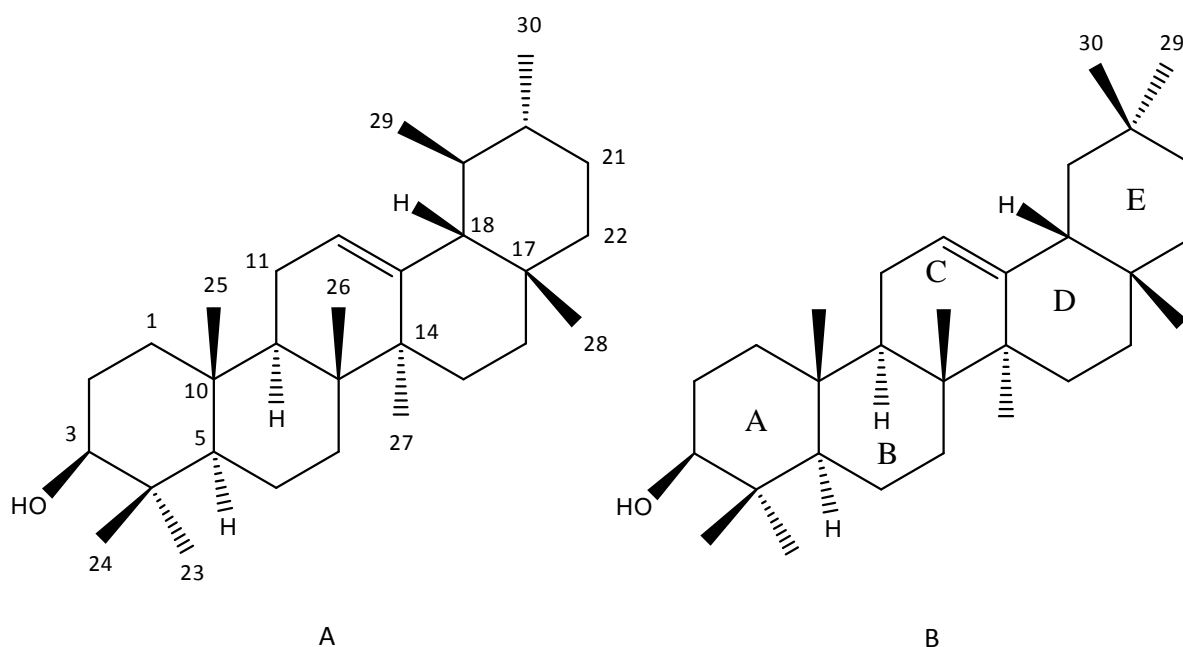


Figura 4: Estrutura química da α -amirina (A) e da β -amirina (B)

A substância foi isolada na forma de um sólido cristalino, que após recristalização formou cristais aculeiformes e faixa de fusão de 176,5-177,5 °C.

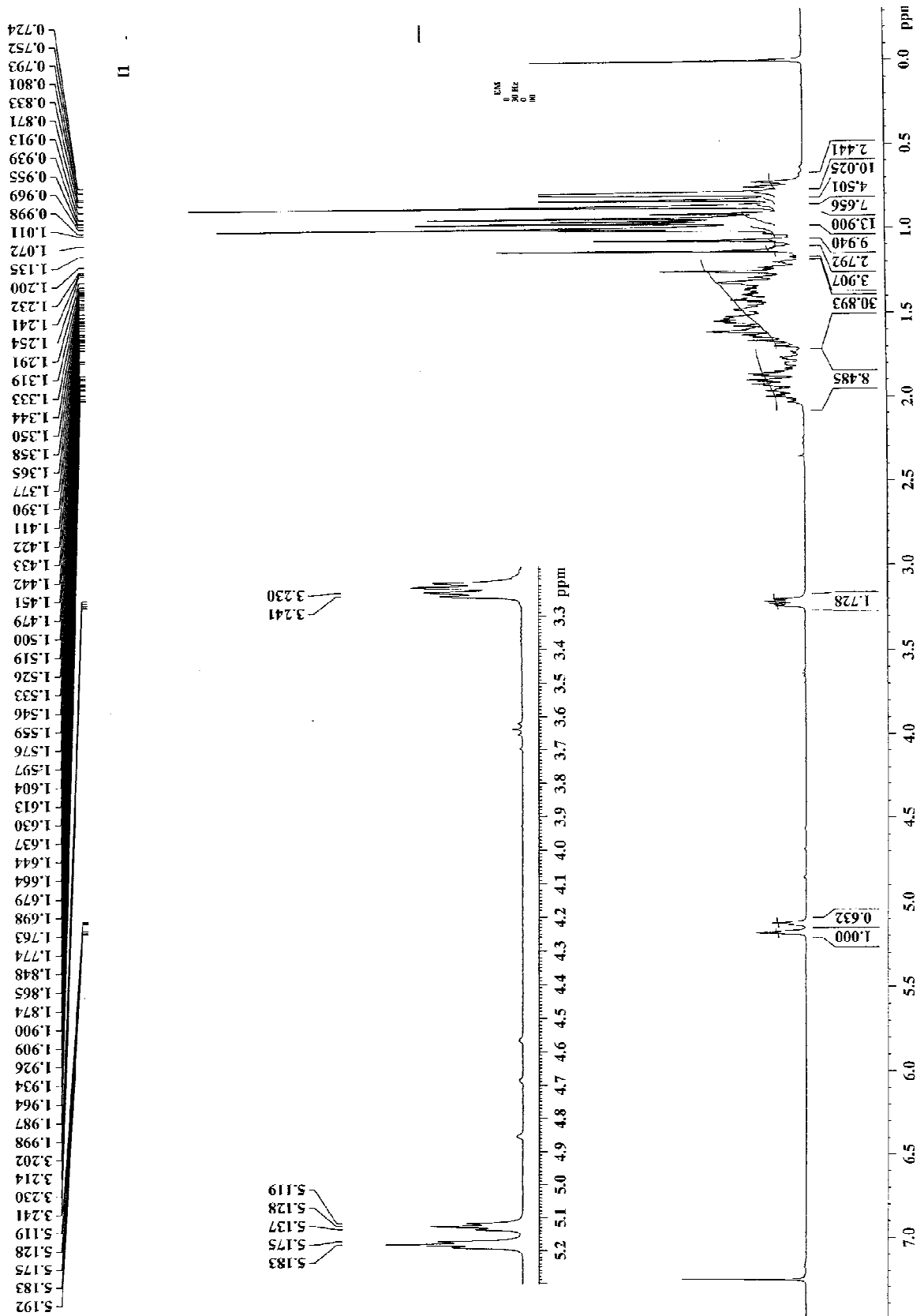


Figura 5: Espectro de RMN de ¹H (400 MHz, CDCl₃) para a substância IH1/IH2

No espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) (Figura 5) foi observado um multiplete (m) na região de deslocamento químico (δ) 3,202 a 3,241 correspondente ao hidrogênio do carbono C-3, ligado à hidroxila de α e β amirina. Em δ 5,128 ($J = 3,6$ Hz) e δ 5,183 ($J = 3,6$ Hz) foram observados dois tripletos (t) atribuídos aos hidrogênios do C-12 de α e β da amirina respectivamente. Foi observado neste espectro um singlete (s) em δ 7,25 que pode ser atribuído ao hidrogênio da hidroxila ligada ao carbono C-3. A presença de 48 hidrogênios no espectro indica a presença das formas isoméricas da amirina.

No espectro de RMN de ^{13}C (100 MHz, CDCl_3) (Figura 6) foram observados sinais característicos de α e β amirina. Os sinais em δ 79,31 e δ 79,34 podem ser atribuídos ao carbono C-3 de α e β amirinas, respectivamente. Sinais característicos dos carbonos da dupla ligação foram observados em δ 124,71 (C-12) e δ 139,87 (C-13) correspondentes a α amirina e em δ 122,01 (C-12) e δ 145,47 (C-13) correspondentes a β amirina. Outros sinais característicos foram observados em δ 40,08 que foi atribuído ao carbono C-20 de α -amirina e em δ 31,36, atribuído ao carbono C-20 de β -amirina. Os sinais em δ 17,74 e δ 21,66 foram atribuídos aos carbonos C-29 e C-30 de α -amirina e os sinais em δ 33,23 e δ 23,97 aos carbonos C-29 e C-30 de β -amirina.

Os demais espectros de RMN obtidos para a substância IH1/IH2 encontram em ANEXOS.

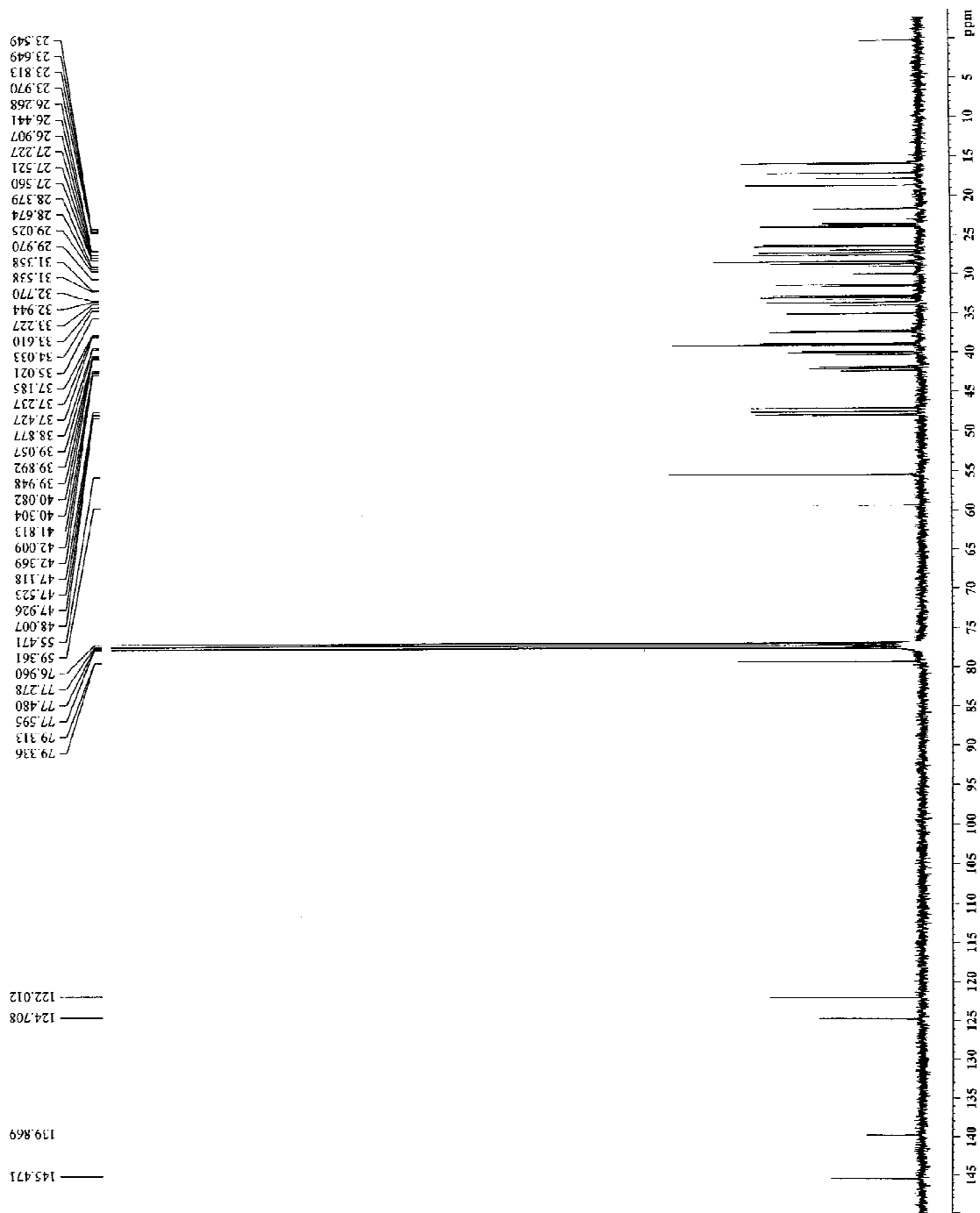


Figura 6: Espectro de RMN de ^{13}C (100MHz, CDCl_3) para a substância IH1/IH2

Tabela 8: Deslocamentos químicos (δ) em ppm obtidos do espectro de RMN de ^{13}C para a substância IH1/IH2 a 100 MHz em CDCl_3 , comparados com dados publicados na literatura (MAHATO & KUNDU, 1994)

Carbono	β -amirina		α -amirina	
	δ da literatura	δ observado	δ da literatura	δ observado
1	38,70	39,06	38,70	38,88
2	27,30	27,56	27,20	27,52
3	79,00	79,34	78,30	79,31
4	38,80	39,95	38,70	39,06
5	55,30	55,47	55,20	55,47
6	18,50	18,69	18,30	18,65
7	32,80	32,94	32,90	32,94
8	38,80	39,89	40,00	40,30
9	47,70	47,93	47,70	48,01
10	37,60	37,43	36,90	35,02
11	23,60	23,81	23,30	23,55
12	121,80	122,01	124,30	124,71
13	145,10	145,47	139,30	139,87
14	41,80	42,01	42,00	42,37
15	26,20	26,44	28,70	29,97
16	27,00	27,23	26,60	26,91
17	32,50	32,77	33,70	33,61
18	47,40	47,52	58,90	59,31
19	46,90	47,12	39,60	39,95
20	31,10	31,36	39,60	40,08
21	34,80	34,03	31,20	31,54
22	37,20	37,24	41,50	41,81
23	28,20	28,67	28,10	28,38
24	15,50	15,77	15,60	15,90
25	15,60	15,86	15,60	15,95
26	16,90	17,15	16,80	17,09
27	26,00	26,27	23,30	23,65
28	28,40	29,02	28,10	28,38
29	33,30	33,23	17,40	17,74
30	23,70	23,97	21,30	21,66

* alguns valores podem estar invertidos.

Na Tabela 8 são apresentados os dados de RMN de ^{13}C obtidos para a amostra IH1/IH2 e os dados da literatura atribuídos à α e β -amirinas (MAHATO & KUNDU, 1994). Em azul, destacam-se os sinais característicos de α e β -amirina.

Vários estudos fitoquímicos demonstram a presença de α e β -amirinas em plantas do gênero *Protium* (MAIA et al., 2000; BANDEIRA et al., 2002; BANDEIRA et al., 2007). Esta mistura é considerada responsável por atividades antiinflamatórias, analgésica, antipruriginosa, hepatoprotetora e antiulcerogênica (OLIVEIRA, 2005).

Uma possível explicação para a atividade farmacológica desta mistura está relacionada com a presença do esqueleto terpênico semelhante a estrutura molecular de fármacos esteróides (OLIVEIRA et al., 2004). Triterpenos com estrutura química semelhante a de α e β -amirina exercem sua atividade antiinflamatória por inibir a expressão de citocinas pró-inflamatórias através da inibição de fatores de transcrição (OLIVEIRA, 2005).

4.1.1.3 Substâncias Isoladas da Fração Diclorometânica

As substâncias ID2, ID3 e ID4 (4,0 mg; 1,7 mg e 7,5 mg; respectivamente) foram isoladas da fração FDCM. Análises qualitativas do teste caracterização de flavonóides com AlCl_3 e os primeiros espectros de RMN de ^1H de ID2, indicam que ela pertence a classe dos flavonóides (Figura 7).

Com base na literatura (MARKHAM, 1982; AGRAWAL, 1989; PONCE et al, 2004; ANDERSEN & MARKHAM, 2006), foi possível chegar a algumas conclusões prévias sobre a estrutura de ID2. Os espectros obtidos para ID2 encontram-se em ANEXOS e os espectros das demais substâncias ainda estão em fase de obtenção.

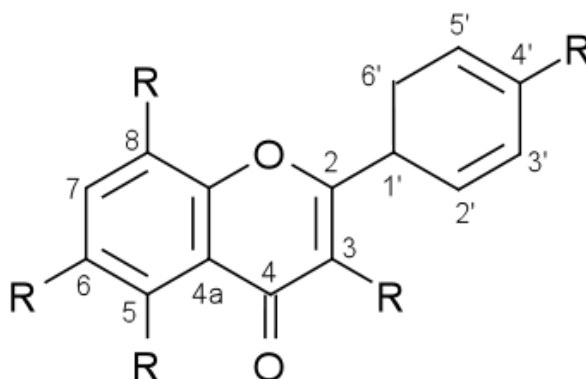


Figura 7: Esqueleto básico de um composto flavonoídico, onde R corresponde ao substituinte.

No espectro de RMN de ^1H de ID2 foram observados dupletos (d) em δ 6,74 ($J = 8$ Hz); δ 6,91 ($J = 8$ Hz) e δ 7,34 ($J = 8,8$ Hz) característicos de compostos da classe de flavonóides.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou sinais em δ 188,21; δ 177,38 e δ 172,93 o que sugere que esse composto apresenta mais de um grupamento carbonila em sua estrutura, posto que sinais em espectros nesta intensidade sugerem a presença deste grupo. Também neste espectro foi possível observar um sinal de δ 134,1 sugerindo que ele pertença a classe dos flavonóis, uma vez que não foram observados sinais característicos de flavonas (δ 108,8).

Sinais característicos da presença de heterosídeos foram observados no espectro de RMN de ^{13}C . Este heterosídeo parece ser a raminose, como podem ser observados os resultados de comparação com a literatura para este heterosídeo (Tabela 9).

Tabela 9: Deslocamentos químicos obtidos para o heterosídeo raminose de ID2 comparados com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989)

Carbonos	δ (ppm) 3-o-rha (AGRAWAL, 1989)	δ (ppm) obtidos no espectro de ID2
1''	102	101,52
2''	71,6	69,97*
3''	72,3	70,83
4''	73,2	71,25
5''	71,4	69,97*
6''	17,8	16,18

* Referem-se a sinais duplicados

Entretanto, pouco se pôde concluir, uma vez que o espectro de carbono apresenta vários sinais de baixa intensidade. Não foi possível definir se estes sinais correspondem ao flavonóide, a alguma impureza presente na amostra ou se são apenas ruídos do espectro.

Desta forma, apenas com os espectros unidimensionais não foi possível elucidar a estrutura da substância, sendo necessária a obtenção dos espectros bidimensionais. Estes espectros foram solicitados ao LAREMAR/UFMG e estamos aguardando estas novas análises, para que possam ser correlacionados esses sinais entre si, definindo se são sinais reais ou ruídos.

4.1.1.4 Substância ID1 isolada de PDCM

A substância ID1 (10,5 mg), isolada de PDCM, foi submetida a análises de RMN de ^1H e de ^{13}C unidimensionais. Entretanto não foi possível obter-se espectros desta substância. Essa substância possui baixa solubilidade em todos os solventes testados (CHCl_3 , CH_2Cl_2 , HEX, AcOEt, MeOH, H_2O , EtOH). É possível sugerir que a impossibilidade de obtenção dos espectros se deve a esta característica da substância ID1.

4.1.1.5 Substância MI4 isolada de FMEOH-F

Análises qualitativas do teste caracterização de flavonóides com AlCl_3 e os primeiros espectros de RMN de ^1H da substância MI4 (6,5 mg), isolada da fração FMEOH-F, sugerem que a substância corresponde a um flavonóide.

O espectro de RMN de ^1H apresentou sinais na região de δ 6,52 d ($J = 8,0$ Hz) e δ 7,09 d ($J = 8,4$ Hz) característicos de compostos da classe de flavonóides, que podem ser atribuídos aos hidrogênios ligados aos $\text{C}3'/\text{C}5'$ e $\text{C}2'/\text{C}6'$ do anel B.

O singleto em δ 5,76 parece ser o singleto do hidrogênio ligado ao $\text{C}7$ do anel A.

O espectro de RMN de ^{13}C apresentou 21 átomos de carbono (15 carbonos atribuídos à genina e 6 carbonos de heterosídeo) sendo 3 deles duplicados (δ 130,62; δ 115,12 e δ 69,98).

O heterosídeo presente no flavonóide parece também ser a ramnonse, uma vez que o espectro de RMN de ^1H apresentou um grupamento metila em δ 0,6 d ($J = 6$ Hz) e o espectro

de RMN de ^{13}C apresentou um sinal em δ 16,33 que pode ser atribuído ao grupamento metila.

Na tabela 10 são apresentados os dados da literatura (AGRAWAL, 1989) comparados com os dados obtidos para RMN de ^{13}C para o heterosídeo ramnose.

Tabela 10: Deslocamentos químicos obtidos para o heterosídeo ramnose de MI4 comparados com os dados da literatura (AGRAWAL, 1989)

Carbonos	δ (ppm) 3-o-rha (AGRAWAL, 1989)	δ (ppm) obtidos no espectro de MI4
1''	102	101,36
2''	71,6	69,98*
3''	72,3	70,67
4''	73,2	71,3
5''	71,4	69,98*
6''	17,8	16,33

* Referem-se a sinais duplicados

O composto não deve ser uma flavanona, pois não são observados sinais no espectro de RMN de ^{13}C referentes aos carbonos C2 e C3 na faixa de 70 e 40 ppm. Também não deve ser uma flavona, pois estes tipos de compostos apresentam um sinal de um hidrogênio em δ 6,7 no espectro de RMN de ^1H . É possível sugerir que o composto seja um flavonol pela presença de δ_c 134,0.

Apesar de algumas definições, ainda pouco se pôde concluir sobre este composto, sendo necessário aguardar os espectros bidimensionais para determinar a correlação dos hidrogênios e dos carbonos, bem como definir em qual posição o glicosídeo encontra-se ligado.

Estamos também aguardando o retorno das amostras para que sejam realizados experimentos de deslocamentos em solventes específicos de UV.

Os espectros obtidos para MI4 de RMN de ^1H e de RMN de ^{13}C encontram-se em ANEXOS.

4.1.2 Prospecção Fitoquímica

Na Tabela 11 estão representados os resultados obtidos através de prospecção fitoquímica do EEB das folhas de *Protium spruceanum*.

Tabela 11: Avaliação da presença dos principais metabólitos secundários no EEB das folhas de *Protium spruceanum*

Metabólito secundário	Taninos e fenóis	Flavonóides	Saponinas	Triterpenos	Esteróides	Xantonas	Cumarinas	Alcalóides
Resultado	+	+	+	+	+	+	+	-

(+) indica resultado positivo, (-) indica resultado negativo.

Os resultados da prospecção fitoquímica para identificação dos metabólitos secundários presentes no EEB das folhas de *Protium spruceanum* indicaram a presença de compostos fenólicos, taninos, flavonóides, saponinas, triterpenos, esteróides, xantonas e cumarinas.

Embora a triagem tenha revelado uma ampla complexidade fitoquímica da composição das folhas, os resultados obtidos para as análises de CLAE-DAD do EEB e frações das folhas de *Protium spruceanum* sugerem que tanto o extrato quanto as frações são pouco complexos. Testes qualitativos de prospecção fitoquímica podem sofrer interferências dos componentes dos extratos e resultarem em falsos positivos e/ou falsos negativos.

Entretanto, a triagem fitoquímica se torna uma importante ferramenta para o conhecimento fitoquímico da espécie, uma vez que não existem relatos na literatura sobre estudos fitoquímicos de *Protium spruceanum*.

4.1.3 Determinação do Teor de Fenóis Totais

O teor de FT para o EEB das folhas de *Protium spruceanum* foi calculado com base na interpolação dos valores de absorvância da amostra contra a curva padrão de ácido gálico cuja equação da reta obtida foi:

$$Y = 0,0015x + 0,2952 \quad R^2 = 0,9908$$

Ao determinar o teor de FT para o EEB das folhas de *Protium spruceanum* pelo Método de Folin-Ciocalteu foi possível verificar um teor de 181 mg EAG/g de EEB. Desta maneira, os resultados mostram que 18,1 % do EEB são de compostos fenólicos.

Os compostos fenólicos ocorrem normalmente em uma grande variedade de plantas e o potencial antioxidante desses compostos tem sido relacionado com a capacidade de doação de radicais hidrogênicos. Além da propriedade antioxidante, outras propriedades biológicas cientificamente comprovadas de extratos de plantas estão relacionadas com a presença desses compostos, tais como antimutagênica, antiestrogênica, antiinflamatória (SILVA et al., 2009).

4.1.4 Determinação do Teor de Flavonóides Totais

O teor de FVT para o EEB das folhas de *Protium spruceanum* e para as frações FMEOH-1, FDCM, PDCM e FMEOH-F foi calculado com base na interpolação dos valores de absorbância da amostra contra curvas padrão de rutina e de quercetina, cujas equações da reta obtidas foram:

$$\text{Quercetina: } y = 0,0588x + 0,138 \quad R^2=0,9919$$

$$\text{Rutina: } y = 0,0227x + 0,2425 \quad R^2=0,9898$$

Na Tabela 12 estão representados os resultados de mg de EQ/g de amostra e mg de ER/g de amostra expressos pela média \pm erro padrão da média (E.P.M.) calculados por regressão linear com base nas equações acima. A Figura 8-A mostra a representação gráfica para os resultados obtidos de EQ/g de amostra e a Figura 8-B para o ER/g de amostra.

Tabela 12: Resultados da determinação do teor de FVT para EEB e frações das folhas de *Protium spruceanum*

Amostras	mg EQ/g amostra	mg ER/g amostra
EEB	0,5 \pm 0,20	0,2 \pm 0,51
FMEOH-1	5,8 \pm 0,64	14,1 \pm 1,65
FMEOH-F	1,1 \pm 0,32	1,8 \pm 0,82
PDCM	7,0 \pm 0,21	17,1 \pm 0,55
FDCM	8,5 \pm 1,27	21,0 \pm 3,28

Dados expressos pela média \pm E.P.M.

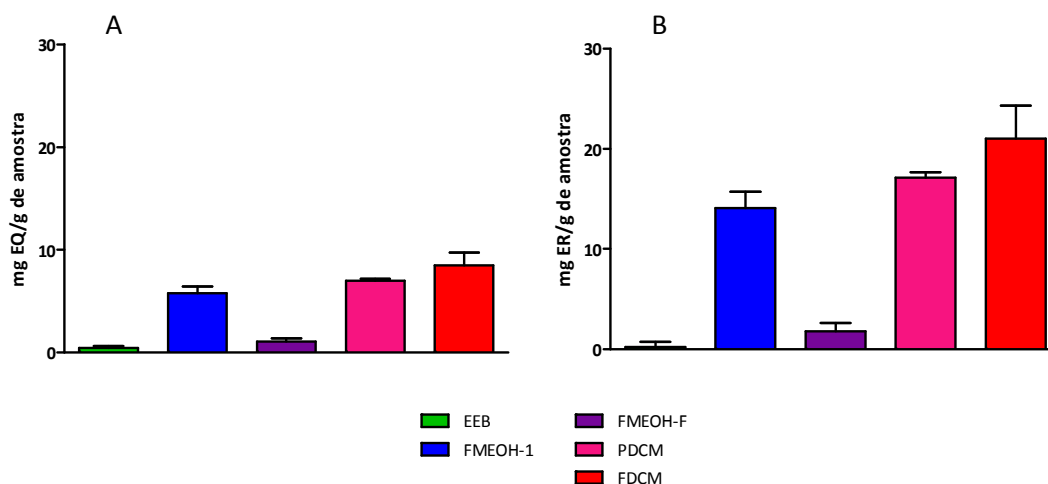


Figura 8: Representação gráfica dos resultados de determinação do teor de FVT para EEB e frações de folhas de *Protium spruceanum*. A – mg EQ/g de amostra, B – mg ER/g de amostra

Rutina e quercetina são dois flavonóides bastante conhecidos e amplamente estudados. A diferença estrutural entre esses flavonóides é a presença de uma glicosilação na posição 3-O. Estes flavonóides são amplamente utilizados como padrões para a pesquisa de flavonóides. A técnica espectrométrica utilizando esses padrões para determinação do teor de FVT foi escolhida por ser simples, rápida, reprodutiva, de baixo custo, além de utilizar menores quantidades de solventes para a realização dos testes comparadas a outras técnicas (CHABARIBERI et al., 2009).

Analisando os resultados foi observado que os flavonóides presentes no EEB ($0,5 \pm 0,20$ mg EQ/g amostra e $0,2 \pm 0,51$ mg ER/g amostra) se concentraram na fração FMEOH-1 ($5,8 \pm 0,64$ mg EQ/g amostra e $14,1 \pm 1,65$ mg ER/g amostra) devido às propriedades físico-químicas dessa classe de metabólitos secundários.

Ao particionar a FMEOH-1 foi observado que a maior parte dos flavonóides se concentrou na fração FDCM ($8,5 \pm 1,27$ mg EQ/g amostra e $21,0 \pm 3,28$ mg ER/g amostra) e no PDCM ($7,0 \pm 0,21$ mg EQ/g amostra e $17,1 \pm 0,55$ mg ER/g amostra).

Ao analisar a Figura 8 foi observado que a mesma concentração das amostras testadas corresponderam a maior quantidade de rutina (Figura 8-B) do que de quercetina (Figura 8-A). Isto se deve ao fato de que a rutina corresponde à uma genina (quercetina) glicosilada. Desta forma, a glicosilação do anel flavonoídico da quercetina faz com que a massa molecular do composto aumente, reduzindo significativamente o número de mols de

agliconas para complexarem-se com o $AlCl_3$, e conseqüentemente reduzindo a coloração após o tempo de incubação.

4.1.5 Determinação da Propriedade Antioxidante

Os resultados da avaliação da propriedade antioxidante (%AA) para o EEB das folhas de *Protium spruceanum* e para as frações FHEX, FMEOH-1, FDCM, PDCM, FMEOH-F e ácido gálico nas concentrações de 5 a 150 $\mu\text{g/mL}$, determinadas pelo ensaio do DPPH estão apresentados na tabela 13. Os valores estão expressos pela média \pm E.P.M.. Os valores de CE_{50} (concentração efetiva para 50% de propriedade antioxidante), calculados por regressão linear estão apresentados na tabela 14, também expressos por média \pm E.P.M..

Tabela 13: Porcentagem de propriedade antioxidante obtida para EEB e frações das folhas de *Protium spruceanum*

Amostras	Concentrações									
	5 µg/mL	10 µg/mL	15 µg/mL	20 µg/mL	25 µg/mL	30 µg/mL	40 µg/mL	50 µg/mL	100 µg/mL	150 µg/mL
EEB	47,9±0,91	63,7±0,53	79,8±0,29	91,7±0,22	95,4±0,06	96,0±0,03	96,0±0,00	96,1±0,00	94,8±0,80	95,3±0,00
FMEOH-1	42,7±0,92	68,9±0,36	78,6±0,19	95,1±0,35	96,1±0,03	96,2±0,00	96,6±0,03	96,3±0,03	96,7±0,03	96,5±0,00
FHEX	4,3±1,88	7,6±0,39		17,5±0,26		13,1±0,24	18,0±0,25	39,1±0,59	40,6±0,12	54,9±0,51
FDCM	33,5±1,07	61,4±0,43	63,3±0,05	92,9±0,42	94,3±0,21	94,4±0,03	94,1±0,03	94,5±0,06	93,8±0,03	92,8±0,05
PDCM	35,9±0,71	42,0±0,16	50,2±0,21	64,0±0,25	80,2±0,38	84,0±0,08	88,3±0,11	95,2±0,03	94,6±0,03	93,9±0,06
FMEOH-F	12,9±0,08	26,1±0,15	38,4±0,26	55,5±0,35	66,8±0,21	69,1±0,11	77,9±0,15	82,6±0,14	93,1±0,17	92,2±0,17
ACIDO GALICO	93,6±0,09	94,5±0,18	94,2±0,06	94,7±0,03	94,9±0,11	95,2±0,03	95,0±0,06	95,1±0,03	95,5±0,00	95,4±0,00

Dados expressos em média±E.P.M..

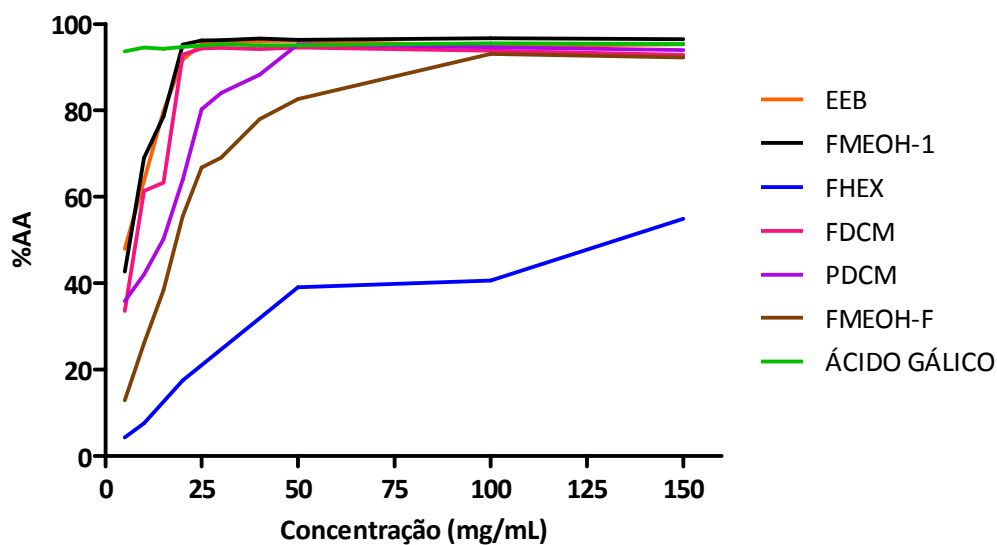


Figura 9: Propriedade Antioxidante *versus* Concentração ($\mu\text{g/mL}$) para o EEB das folhas de *Protium spruceanum* e para as frações do EEB

Foi possível observar que o EEB possui considerável propriedade antioxidante, atingindo porcentagem de atividade acima de 95% (atividade máxima) com a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 9).

Na Tabela 14 e na Figura 10-A estão representados os resultados obtidos para as análises de CE_{50} para o EEB e para as frações obtidas pela primeira partição desse extrato. Após a partição do EEB em MeOH:H₂O/Hex, observou-se CE_{50} $6,1 \pm 0,13$ $\mu\text{g/mL}$ para a fração FMEOH-1 e CE_{50} $132,3 \pm 0,33$ $\mu\text{g/mL}$ para FHEX.

Tabela 14: CE_{50} para EEB das folhas de *Protium spruceanum* e para as frações FHEX e FMEOH-1

Amostras	$\text{CE}_{50} \pm \text{ERRO}$ ($\mu\text{g/mL}$)
EEB	$5,4 \pm 0,16$
FMEOH-1	$6,1 \pm 0,13$
FHEX	$132,3 \pm 0,33^*$

Resultados expressos pela média \pm E.P.M..

Testes estatístico Kruskal-Wallis – Teste de comparações múltiplas de Dunn's

* $p < 0,05$ vs ácido gálico

A fração FMEOH-1 atinge máximos de atividade na concentração 25 µg/mL. Os resultados obtidos para a FHEX são significativamente diferentes dos resultados para o ácido gálico (CE_{50} 2,7±0,002 µg/mL).

Tal fato deve-se ao elevado teor de compostos fenólicos presente no EEB e que, após a partição, direcionam-se para a fração polar. Os compostos fenólicos, que possuem natureza polar, tendem a se concentrar na fração hidroalcoólica (SIMÕES et al., 2004).

Na Tabela 15 e na Figura 10-B estão representados os resultados obtidos para CE_{50} após a partição da fração FMEOH-1 em $CH_2Cl_2/MeOH:H_2O$ (9:1).

Tabela 15: CE_{50} para as frações obtidas após a partição de FMEOH-1 em $CH_2Cl_2/MeOH:H_2O$ (9:1)

Amostras	$CE_{50} \pm ERRO$ (µg/mL)
FDCM	8,7 ± 0,09
PDCM	13,2 ± 0,20
FMEOH-F	18,6 ± 0,03*
ACIDO GALICO	2,7 ± 0,002

Resultados expressos pela média ± E.P.M..

Testes estatístico Kruskal-Wallis – Teste de comparações múltiplas de Dunn's. $p < 0,05$ vs ácido gálico

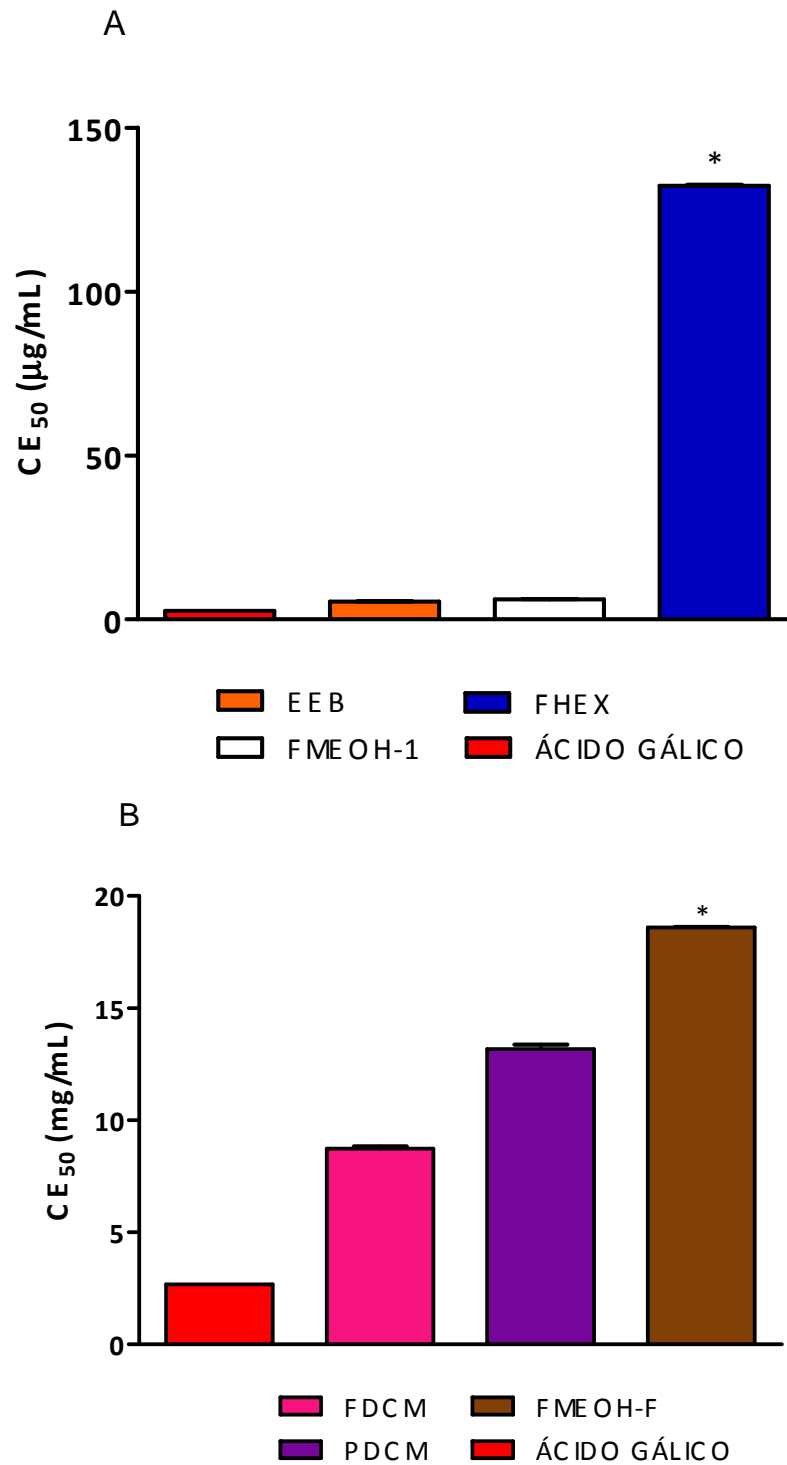


Figura 10: Comparação dos valores de CE₅₀ (µg/mL) de propriedade antioxidante do EEB das folhas de *Protium spruceanum* e das frações do EEB versus ácido gálico. A – EEB, MEOH-1 e FHEX. B – FMEOH-F, FDCM, PDCM. Resultados expressos pela média ± E.P.M.. Análise estatística: Teste Kruskal-Wallis – Teste de comparações múltiplas de Dunn's. *p<0,05 vs ácido gálico

Analisando os resultados foi observado que os compostos de propriedade antioxidante presentes na fração FMEOH-1 se distribuíram nas frações FDCM, PDCM e FMEOH-F. Segundo Simões e colaboradores (2004) solventes de polaridade crescente podem ser utilizados para fracionar os compostos fenólicos obtendo-se separadamente compostos na forma livre, na forma de ésteres e na forma de heterosídeos.

Comparando as propriedades antioxidantes destas frações, foi observado uma maior atividade para a fração FDCM, atingindo propriedade antioxidante máxima na concentração 25 µg/mL, o que sugere compostos em maior quantidade ou com maior atividade.

A propriedade antioxidante observada para o EEB e para as frações, corroboram os resultados obtidos para a determinação de FT para o EEB, onde foi observado 18,1 % de compostos fenólicos em sua composição.

Vários trabalhos na literatura sugerem a relação entre as atividades antioxidante e antiinflamatória. Embora não seja possível inferir com precisão quais os compostos responsáveis pela propriedade antioxidante do EEB e posteriormente das frações FMEOH-1, FDCM, FMEOH-F e PDCM, os resultados dos testes de FT e FVT, bem como os primeiros espectros de RMN de ¹H sugerem que os flavonóides podem ser parcialmente responsáveis por estas atividades.

4.2 Experimentos “in vivo”

4.2.1 Avaliação da Toxicidade Aguda

O EEB das folhas de *Protium spruceanum* administrado v.o. até a dose de 6000 mg/kg não demonstrou nenhum sinal de toxicidade evidente e não provocou morte dos animais durante o período avaliado. Desta maneira, não foi possível estimar a DL₅₀ para o EEB e é possível sugerir a baixa toxicidade desse EEB.

Alguns estudos relatam a ausência de toxicidade em espécies do gênero *Protium*. Siani e colaboradores (1999) relataram a ausência de toxicidade do óleo essencial de folhas e da resina de espécies de *Protium* (SIANI et al., 1999). Em estudos realizados por Oliveira (2005) não foi possível determinar a DL₅₀ em ratos para a administração oral da resina até a dose de 5 g/kg e da mistura α e β-amirinas até a dose de 2 g/kg, sugerindo uma baixa

toxicidade da resina de *Protium heptaphyllum* e da mistura α e β -amirinas (OLIVEIRA, 2005).

4.2.2 Avaliação da Atividade Antiedematogênica

O modelo de inflamação *in vivo* induzido por carragenina é um método bastante utilizado para determinação de atividade de agentes antiinflamatórios uma vez que o edema induzido por carragenina não produz efeitos sistêmicos, possui alta reprodutibilidade, além de ter uma ação inflamatória que pode ser inibida por agentes antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais (WINTER et al., 1962).

Este modelo representa a instalação da inflamação, através da formação do edema, por três fases. Inicialmente ocorre liberação de histamina e serotonina no local de injeção do agente causador da inflamação. A segunda fase é mediada pela liberação de cininas, principalmente bradicininas e na fase final ocorre a liberação de prostaglandinas (DI ROSA et al., 1971). É sensível a maioria dos fármacos antiinflamatórios clinicamente efetivos (ERDEMOGLU et al., 2009).

Estudos realizados por Guzzo (2007) demonstraram que o uso de paquímetro para mensurar o edema induzido por carragenina é tão efetivo quanto o pletismômetro comumente utilizado para realizações desse teste (FERREIRA, 1979) e se mostrou mais sensível na mensuração do edema induzido por carragenina a 0,1% na terceira hora do experimento (GUZZO, 2007).

Inicialmente o EEB foi submetido ao método de edema de pata induzido por carragenina para avaliar sua atividade antiedematogênica. Na Tabela 16 estão representados os resultados obtidos para a variação percentual da espessura das patas dos animais durante o método de edema de pata induzido por carragenina nos tempos 1 a 5 horas do teste, em relação o tempo 0. Os dados são expressos pela média \pm E.P.M..

Tabela 16: Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para EEB das folhas de *Protium spruceanum*

Grupos	Tempo de Reação				
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas
Controle	28,5±3,97	27,0±3,58	29,4±1,75	31,5±3,60	25,2±2,70
Indometacina	18,9±3,11	12,5±2,50*	10,6±1,70*	10,5±3,00*	9,9±2,46*
EEB 150 mg/kg	29,0±3,41	22,5±2,76	21,7±1,10	18,5±2,35	15,5±3,33
EEB 200 mg/kg	1,4±0,92*	1,3±1,00*	4,0±1,29*	3,4±3,85*	13,4±1,80
EEB 300 mg/kg	26,4±0,75	16,1±3,06	5,7±3,68*	1,8±1,89*	5,1±0,99*
EEB 400 mg/kg	1,9±0,68*	5,7±2,30*	2,7±1,08*	3,3±1,22*	6,9±2,58*

Administração de EEB (150, 200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1 %, v.sp., 0,02 mL/pata). Dados representam a variação da espessura das patas (%) em relação ao tempo 0, expressos pela média ± E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni *p<0,05 comparado ao grupo controle.

Na terceira hora, quando ocorre o pico de inflamação (CARVALHO et. al, 1999) foi observado percentual de variação de 29,4 ± 1,75 % que persistiu na quarta hora (31,5 ± 3,60 %).

Na Figura 11 estão representados os resultados de percentual de variação na terceira (Figura 11-A) e quarta hora (Figura 11-B), respectivamente.

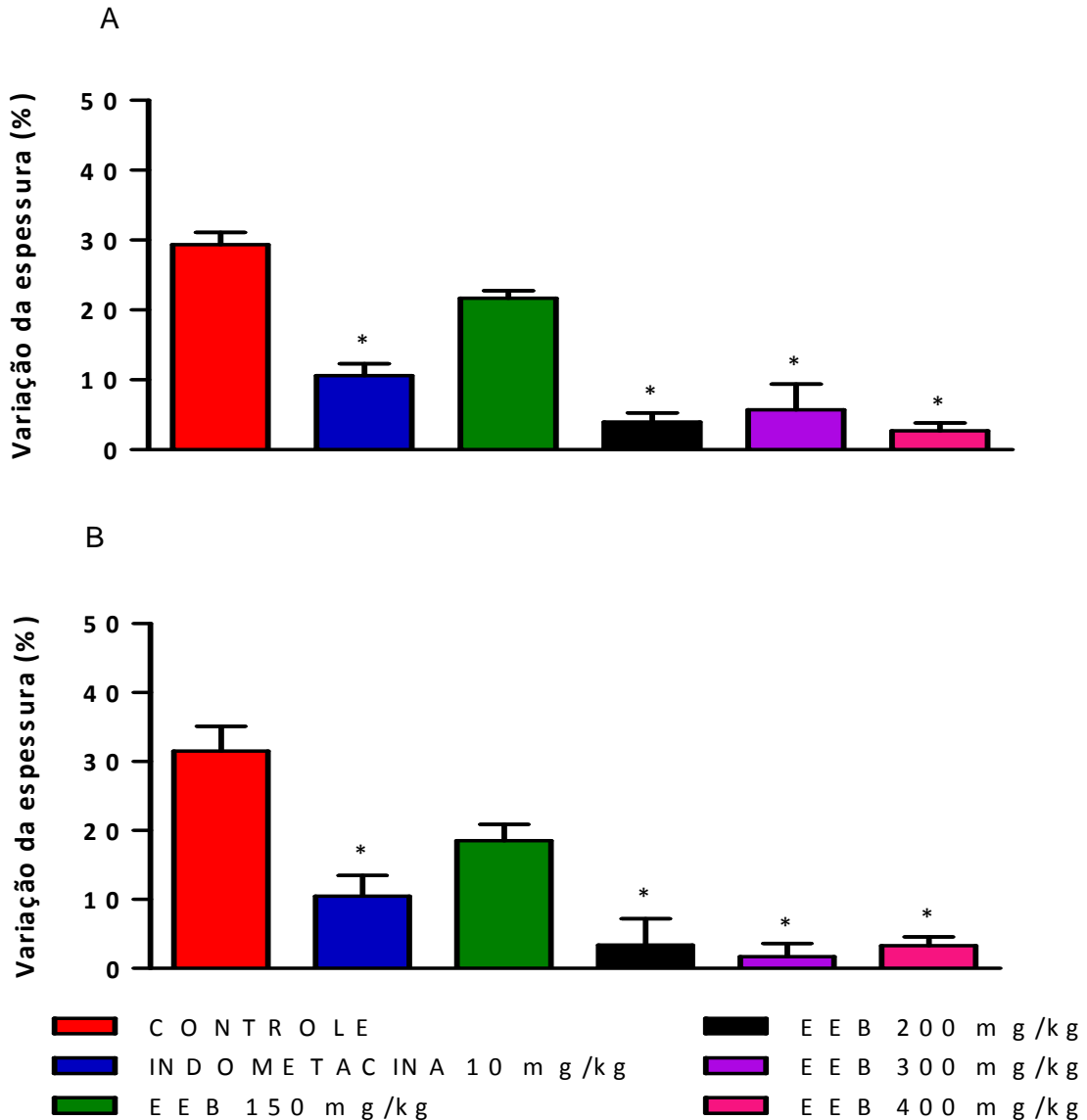


Figura 11: Efeito da administração oral de EEB das folhas de *Protium spruceanum* no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira hora (A) e quarta hora (B). EEB (150, 200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e veículo (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1 %, v.sp., 0,02 mL/pata). Dados representam a variação percentual da espessura das patas em relação ao tempo 0 (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo veículo.

Analisando os resultados do edema na terceira hora (Figura 11-A) e na quarta hora (Figura 11-B) foi possível observar que doses de EEB acima de 200 mg/kg e de Indometacina (10 mg/kg) causam inibição estatisticamente significativa do edema na terceira e quarta horas após a administração de carragenina a 0,1 %. Foi observado que, na

terceira hora, o EEB nas doses 200, 300 e 400 mg/kg foi capaz de inibir significativamente o edema comparado ao grupo controle. Este efeito foi semelhante ao observado para indometacina.

Na quarta hora, o efeito observado na terceira hora persiste (Figura 11-B, Tabela 16). Efeitos antiinflamatórios estatisticamente significativos foram observados para EEB nas doses 200, 300 e 400 mg/kg e para indometacina utilizada como padrão de atividade antiinflamatória.

Diante dos resultados da avaliação da atividade antiedematogênica do EEB, este extrato foi submetido a partição Hex/MeOH:H₂O (9:1) e as frações obtidas (FMEOH-1 e FHEX) foram submetidas ao método de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados para FMEOH-1 e FHEX estão representados na Tabela 17.

Tabela 17: Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para FMEOH-1 e FHEX

Grupos	Tempo de Reação				
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas
Controle	27,3±4,68	25,9±5,84	29,2±2,11	31,2±5,22	22,6±3,15*
Indometacina	19,5±3,88	11,4±2,93*	11,0±2,20*	9,9±3,76*	9,2±2,83
FHEX 200 mg/kg	3,8±1,83*	8,1±3,09	4,6±3,18*	8,6±3,55*	8,3±2,67*
FHEX 300 mg/kg	6,3±2,20*	5,4±2,23*	4,6±2,76*	8,1±2,61*	10,2±3,32
FHEX 400 mg/kg	5,1±3,74*	5,5±1,52*	6,2±2,93*	6,6±1,86*	5,0±1,60*
FMEOH-1 200 mg/kg	4,6±1,13*	3,5±1,40*	6,4±3,29*	16,1±3,26	15,1±3,19
FMEOH-1 300 mg/kg	3,2±0,97*	1,4±0,54*	7,1±2,09*	11,6±2,89*	10,4±2,55
FMEOH-1 400 mg/kg	2,2±1,46*	-0,2±1,76*	2,9±1,92	8,6±2,27*	11,4±2,27

Administração das frações FMEOH-1 e FHEX (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) de folhas de *Protium spruceanum*, indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5% em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1%, v.sp., 0,02 mL/pata). Dados representam a variação da espessura das patas (%) em relação ao tempo 0, expressos pela média ± E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 comparado ao grupo controle.

Resultado semelhante ao observado para o EEB foi observado para as frações FMEOH-1 e FHEX. Foi possível observar que a solução de carragenina administrada a 0,1 % nas patas dos animais provocou um pico de inflamação na terceira hora (Figura 12-A) após a injeção no grupo controle que persistiu na quarta hora (Figura 12-B).

Os resultados de variação percentual da espessura das patas dos animais durante o método de edema de pata induzido por carragenina nos tempos 1 a 5 horas, em relação o tempo 0 estão representados na Figura 12-A para a terceira hora e na Figura 12-B para a quarta hora. Os dados são expressos pela média \pm E.P.M..

Analisando esses resultados foi observado que na dose de 10 mg/kg indometacina, conhecida substância antiinflamatória, inibiu significativamente o edema induzido por carragenina ($11,0 \pm 2,20$ %) na terceira hora comparado ao grupo controle ($29,2 \pm 2,11$ %) (Figura 12-A). Essa diferença persistiu na quarta hora, como observado na Figura 12-B.

Para a FHEX, de onde foi isolada a mistura α e β -amirinas, também foi observada atividade antiedematogênica estatisticamente significativa nas doses de 200, 300 e 400 mg/kg na terceira e na quarta hora, comparado ao grupo controle.

A atividade antiedematogênica de FHEX pode ser atribuída a presença de α e β -amirinas isoladas desta fração. Esta atividade já fôra descrita e atribuída a esta mistura de substâncias isolada de outras espécies do gênero *Protium* (OTUKI et al., 2005; MEDEIROS et al., 2007b).

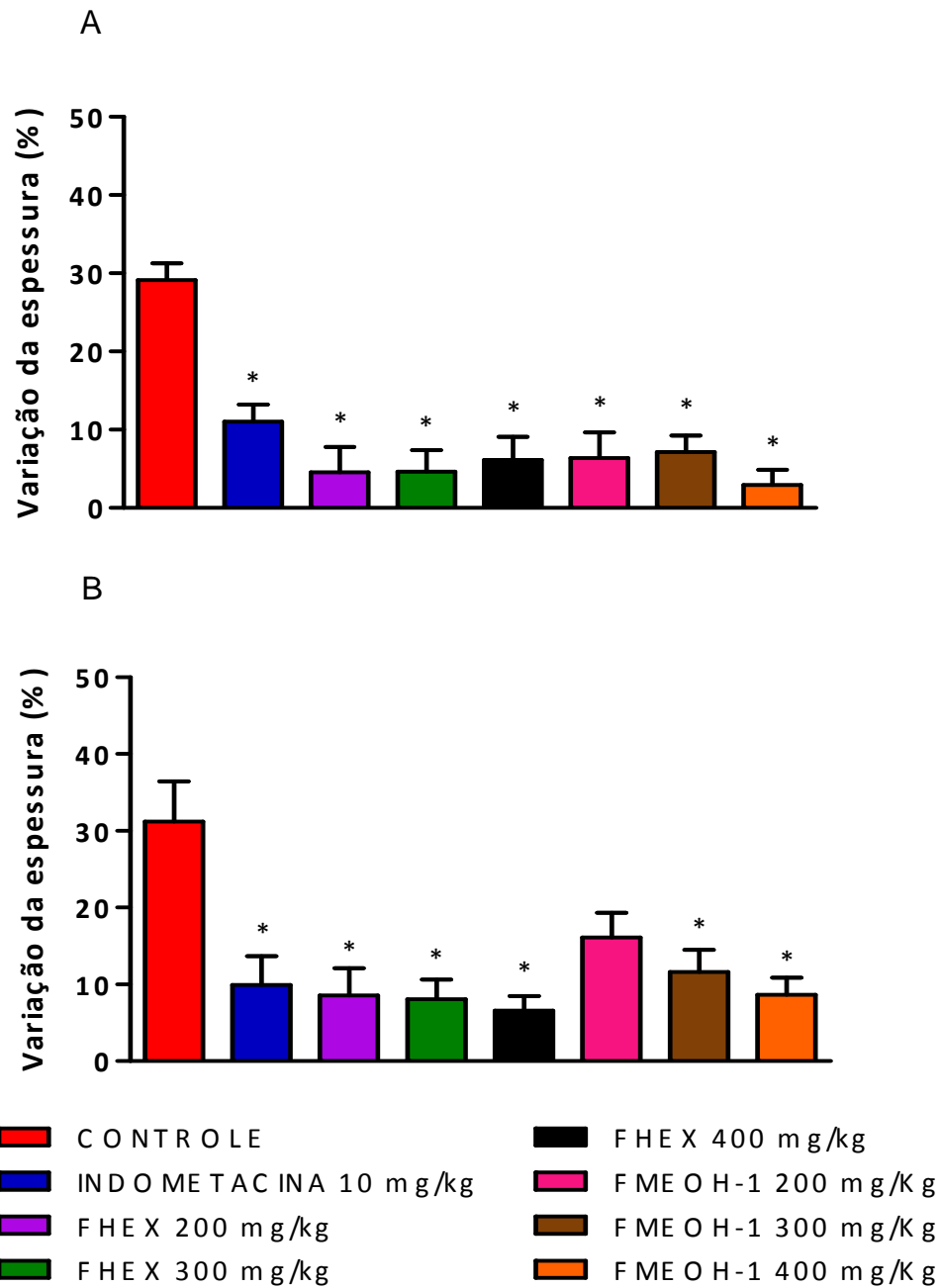


Figura 12: Efeito da administração oral de FMEOH-1 e FHEX após partição do EEB das folhas de *Protium spruceanum* no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira hora (A) e quarta hora (B). FHEX e FMEOH-1 (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10mg/kg, v.o., 0,2mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1 %, v.sp., 0,02mL/pata). Dados representam a variação percentual da espessura das patas em relação ao tempo 0 (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle.

Pela primeira vez é relatada a presença de atividade antiedematogênica para frações polares e de polaridade intermediária de espécies do gênero *Protium*. A fração FMEOH-1 apresentou inibição estatisticamente significativa do edema nas doses de 200, 300 e 400 mg/kg quando comparados ao grupo controle na terceira hora (Figura 12-A) e nas doses de 300 e 400 mg/kg na quarta hora (Figura 12-B).

A atividade antiedematogênica das frações obtidas após o refractionamento de FMEOH-1 em $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}:\text{H}_2\text{O}$ (9:1) foi analisada frente ao método de edema de pata induzido por carragenina. Os resultados obtidos foram compilados na Tabela 18.

Tabela 18: Perfil do método de edema de pata induzido por carragenina para FMEOH-F, FDCM e PDCM

Grupos	Tempo de Reação				
	1 hora	2 horas	3 horas	4 horas	5 horas
Indometacina	19,9±3,37	11,9±2,09*	10,8±2,20*	11,1±2,72	10,1±2,28
Controle	32,8±5,46	30,7±3,31	30,7±2,38	28,3±5,05	24,6±4,00
FMEOH-F 200 mg/kg	11,0±2,24	1,9±2,61*	12,3±4,76	18,4±5,42	21,3±2,91
FMEOH-F 300 mg/kg	12,8±2,87	1,3±1,55*	3,0±3,14*	3,2±2,00*	14,4±4,96
FMEOH-F 400 mg/kg	15,4±3,70	6,0±2,41*	5,9±2,57*	4,5±1,61*	1,7±1,58*
FDCM 200 mg/kg	31,3±5,73	19,4±6,71	5,8±6,31*	1,9±4,93*	2,5±7,81*
FDCM 300 mg/kg	17,5±5,70	8,3±4,91*	3,3±1,38*	-1,3±3,26*	-2,0±2,64*
FDCM 400 mg/kg	16,3±4,98	5,9±2,79*	1,1±3,45*	-4,4±3,91*	-5,7±3,74*
PDCM 200 mg/kg	20,1±4,88	19,2±6,22	20,5±4,32	17,5±3,05	15,4±4,09
PDCM 300 mg/kg	23,5±7,20	12,8±6,44	16,5±6,37	11,0±6,34	7,4±5,51
PDCM 400 mg/kg	21,9±6,97	11,3±3,95	11,8±4,39	14,2±6,09	12,4±3,98

Administração das frações FMEOH-F, FDCM e PDCM (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) de folhas de *Protium spruceanum*, indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1 %, v.sp., 0,02 mL/pata). Dados representam a variação da espessura das patas (%) em relação ao tempo 0, expressos pela média ± E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 comparado ao grupo controle.

Os resultados obtidos para a administração das frações FMEOH-F, PDCM e FDCM para terceira e quarta hora estão representados na Figura 13-A e Figura 13-B, respectivamente.

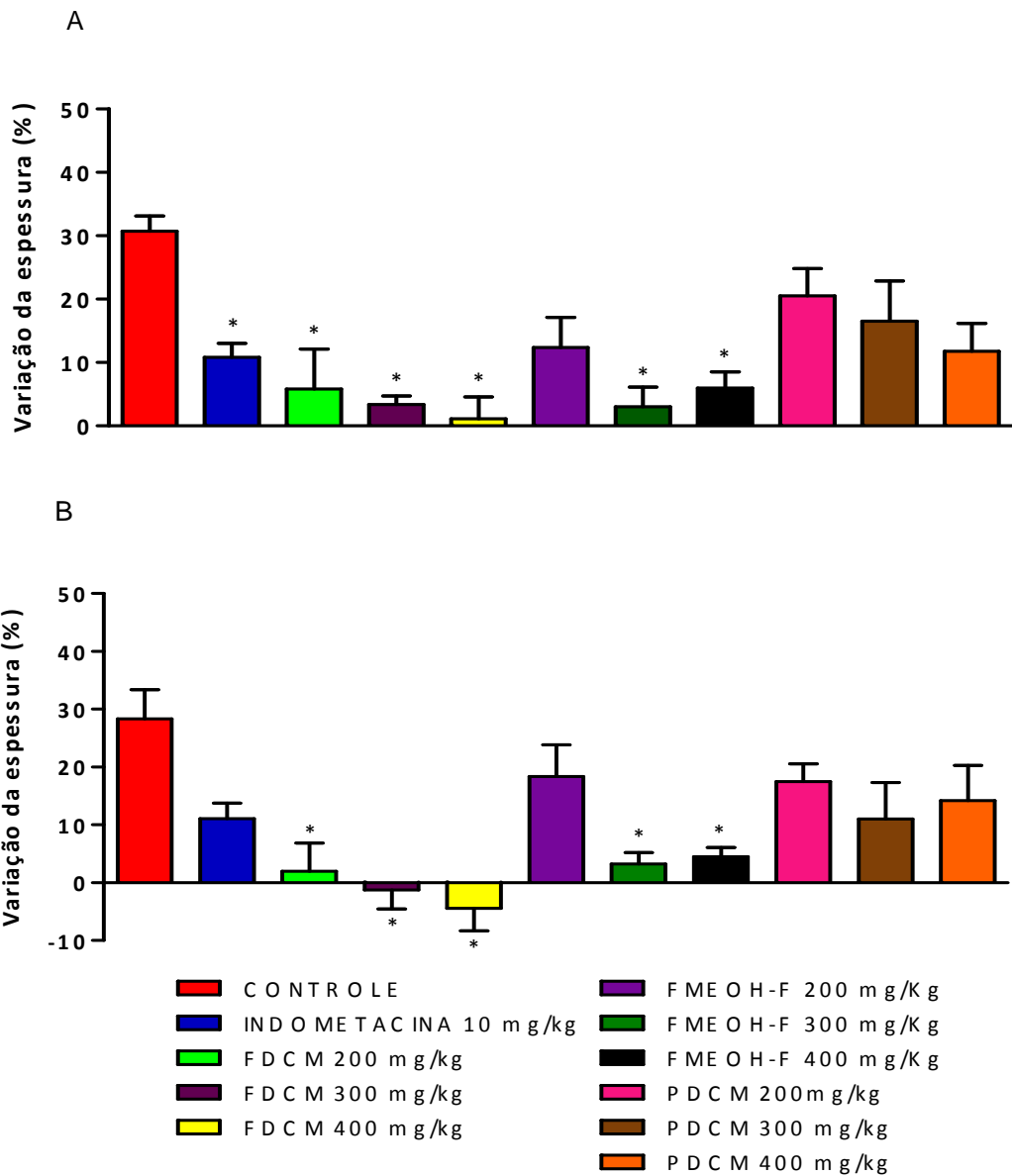


Figura 13: Efeito da administração oral de FMEOH-F, FDCM e PDCM após partição da FMEOH-1 no edema de pata induzido por carragenina em camundongos na terceira (A) e na quarta (B) horas. FMEOH-F, FDCM e PDCM (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da injeção de carragenina (0,1 %, v.sp., 0,02 mL/pata). Dados representam a variação percentual da espessura das patas em relação ao tempo 0 (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Analisando os resultados obtidos, foi possível observar que na terceira hora a fração FMEOH-F produziu inibição estatisticamente significativa do edema quando administrada nas doses 300 e 400 mg/kg comparado ao grupo controle. Este efeito persistiu na quarta hora quando a fração FMEOH-F (300 e 400 mg/kg) foi capaz de continuar inibindo de maneira estatisticamente significativa o edema.

Analisando os resultados obtidos para FDCM na terceira hora (Figura 13-A) foi observado que esta fração inibiu significativamente o edema nas três doses administradas quando comparado ao grupo controle. Este efeito persistiu na quarta hora.

Na análise das frações finais da partição do EEB, foi possível observar que apenas PDCM não apresentou atividade antiedematogênica. É provável que após a partição os compostos com atividade antiedematogênica, anteriormente presentes na fração FMEOH-1, concentraram-se nas frações FDCM e FMEOH-F.

A atividade antiedematogênica presente em FMEOH-1 e que persiste em FDCM e FMEOH-F pode estar relacionada a presença de compostos fenólicos nas frações mais polares e de polaridade intermediária.

Os flavonóides de polaridade alta ou intermediária, importante classe de compostos fenólicos, são detentores de ação antiinflamatória e antioxidante (DA SILVA et al., 2002; RUIZ et al., 2008; ERDEMOGLU et al., 2009).

Estudos demonstram que a atividade antiinflamatória de vários flavonóides pode estar relacionada com a ação destes no organismo diretamente sobre a síntese de mediadores da inflamação (DA SILVA et al., 2002). Diante dos resultados obtidos de teor de FVT e dos primeiros espectros das substâncias isoladas, é possível sugerir que a atividade antiinflamatória dessas frações pode estar relacionada a presença desta classe de compostos.

É de grande importância a identificação de atividade antiinflamatória no EEB de folhas de *Protium spruceanum* e nas frações do EEB, uma vez que agentes antiinflamatórios não-esteroidais apresentam risco potencial para gerar lesões gástricas. Resultados promissores foram obtidos por Oliveira (2005) quanto a propriedades antiinflamatória, hepatoprotetora e gastroprotetora da resina de *Protium heptaphyllum* bem como da mistura α e β -amirina isolada desta resina. Desta forma, a comprovação da atividade antiinflamatória do extrato e das frações de *Protium spruceanum* corroboram as pesquisas de Oliveira (2005)

para o gênero e de acordo com essas pesquisas confirmam o potencial antiinflamatório da mistura de α e β -amirina isolada.

É importante determinar a substância responsável pela atividade antiinflamatória das frações FDCM e FMEOH-F.

4.2.3 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

A atividade antinociceptiva *in vivo* foi avaliada utilizando os métodos de placa quente e de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético que avaliam a atividade antinociceptiva central e periférica, respectivamente (VERMA et al., 2005); e pelo método de formalina que avalia o estímulo nociceptivo em duas fases distintas. A Fase I, ou fase neurogênica, tem sido atribuída ao efeito direto e imediato do agente nocivo sobre as fibras aferentes nociceptivas (ABADDIE et al., 1997) e a Fase II, ou fase inflamatória, representa a dor causada pela inflamação local (HUNSKAAR et al., 1985; HUNSKAAR & HOLE, 1987).

4.2.3.1 Método de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O modelo animal de contorções tem sido usado como uma ferramenta importante para a investigação de propriedades analgésica e antiinflamatória. A nocicepção provocada pelo ácido acético pode estar relacionada à liberação de mediadores endógenos da inflamação tais como cininas, substância P, prostaglandinas e citocinas. Esta nocicepção pode ser bloqueada por substâncias antiinflamatórias não esteroidais, narcóticos e outros fármacos de ação central (SOLDI et al., 2008).

O método de contorções abdominais induzidas por ácido acético possui boa sensibilidade, entretanto possui baixa especificidade, o que pode gerar erros na interpretação dos resultados. Desta maneira é necessário complementar o teste com outros modelos de nocicepção (SOLDI et al., 2008).

Na Tabela 19 estão representados os resultados obtidos através do método de contorções, primeiramente realizado para o EEB das folhas de *Protium spruceanum*. Os resultados mostram o número de contorções abdominais contados a cada 5 minutos nos 25

primeiros minutos após a injeção do agente nociceptivo e também o número total de contorções abdominais e estão expressos pela média \pm E.P.M..

Na Figura 14 estão representados os números médios de contorções abdominais totais para o EEB administrado nas doses 100, 200, 300 e 400 mg/kg e para indometacina (10 mg/kg) comparado ao grupo controle.

Tabela 19: Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para EEB das folhas de *Protium spruceanum*

Grupos/Tempo	Número de Contorções					
	0min a 4min59s	5min a 9min59s	10min a 14min59s	15min a 19min59s	20min a 24min59s	Total
Controle	6,5 \pm 2,86	13,0 \pm 0,45	13,3 \pm 1,86	10,2 \pm 2,41	9,7 \pm 2,46	52,7 \pm 4,74
Indometacina	0,0 \pm 0,0	4,3 \pm 0,76	8,5 \pm 1,31	7,3 \pm 0,76	6,8 \pm 0,75	27,0 \pm 2,83*
EEB 100 mg/kg	1,3 \pm 0,52	6,1 \pm 1,44	7,2 \pm 1,22	4,4 \pm 0,73	3,2 \pm 0,72	22,1 \pm 3,78*
EEB 200 mg/kg	2,1 \pm 0,93	6,5 \pm 1,45	6,7 \pm 1,02	5,4 \pm 0,57	3,4 \pm 0,73	24,1 \pm 3,78*
EEB 300 mg/kg	1,6 \pm 0,75	6,4 \pm 1,23	5,0 \pm 0,79	5,2 \pm 0,73	4,1 \pm 0,72	22,3 \pm 3,26*
EEB 400 mg/kg	0,7 \pm 0,42	5,5 \pm 1,52	6,4 \pm 1,15	4,5 \pm 0,81	3,7 \pm 0,75	20,8 \pm 3,82*

Administração do EEB das folhas de *Protium spruceanum* (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais a cada 5 minutos e o número de contorções totais expressos pela média \pm E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni *p<0,05 comparado ao grupo controle.

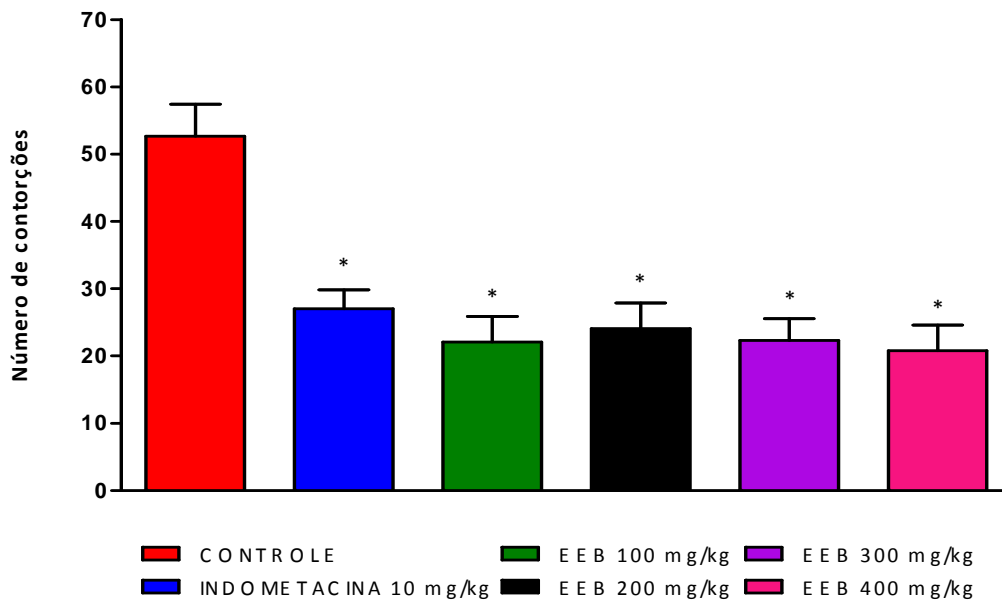


Figura 14: Efeito da administração oral do EEB de *Protium spruceanum* no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos. EEB (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais totais. (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.

Os resultados mostraram que o EEB apresentou redução estatisticamente significativa no número de contorções abdominais totais induzidas pelo ácido acético para as doses de 200, 300 e 400 mg/kg comparado ao grupo controle. A indometacina, fármaco padrão, também foi capaz de reduzir significativamente o número total de contorções abdominais.

Diante dos resultados obtidos para o método de contorções abdominais para o EEB de folhas de *Protium spruceanum*, as frações FMEOH-1 e FHEX foram submetidas ao teste e os resultados obtidos estão representados na tabela 20 e foram expressos pela média \pm E.P.M..

Tabela 20: Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para FHEX e FMEOH-1

Grupos/Tempo	Número de Contorções					
	0min a 4min59s	5min a 9min59s	10min a 14min59s	15min a 19min59s	20min a 24min59s	Total
Controle	1,7±0,67	14,7±2,14	16,2±1,78	15,0±1,69	14,5±1,57	62,0±4,93
Indometacina	0,2±0,17	5,7±1,59	7,7±0,99	6,2±1,01	6,2±1,01	25,8±3,86*
FHEX 200 mg/kg	0,7±0,36	8,1±3,91	6,7±3,15	4,4±1,91	2,1±1,20	22,1±9,79*
FHEX 300 mg/kg	2,3±1,38	13,7±3,70	8,7±1,67	6,8±0,83	5,2±1,08	36,7±6,73
FHEX 400 mg/kg	2,8±1,64	7,2±1,28	4,8±0,54	3,0±0,37	2,0±0,45	19,8±2,73*
FMEOH-1 200 mg/kg	0,0±0,0	3,6±0,95	5,1±1,42	4,9±1,42	4,4±1,04	18,0±4,55*
FMEOH-1 300 mg/kg	0,0±0,0	0,7±0,36	3,0±0,69	5,1±1,44	5,6±1,34	14,4±3,29*
FMEOH-1 400 mg/kg	0,2±0,17	8,5±1,78	11,2±1,89	9,2±1,45	9,3±1,78	38,3±6,13

Administração das frações FHEX e FMEOH-1 (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) após partição do EEB das folhas de *Protium spruceanum*, indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais a cada 5 minutos e o número de contorções totais expressos pela média ± E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 comparado ao grupo controle

Na Figura 15 estão representadas as médias totais de contorções abdominais para as frações FHEX e FMEOH-1 nas doses 200, 300 e 400 mg/kg e para indometacina (10 mg/kg) comparado ao grupo controle.

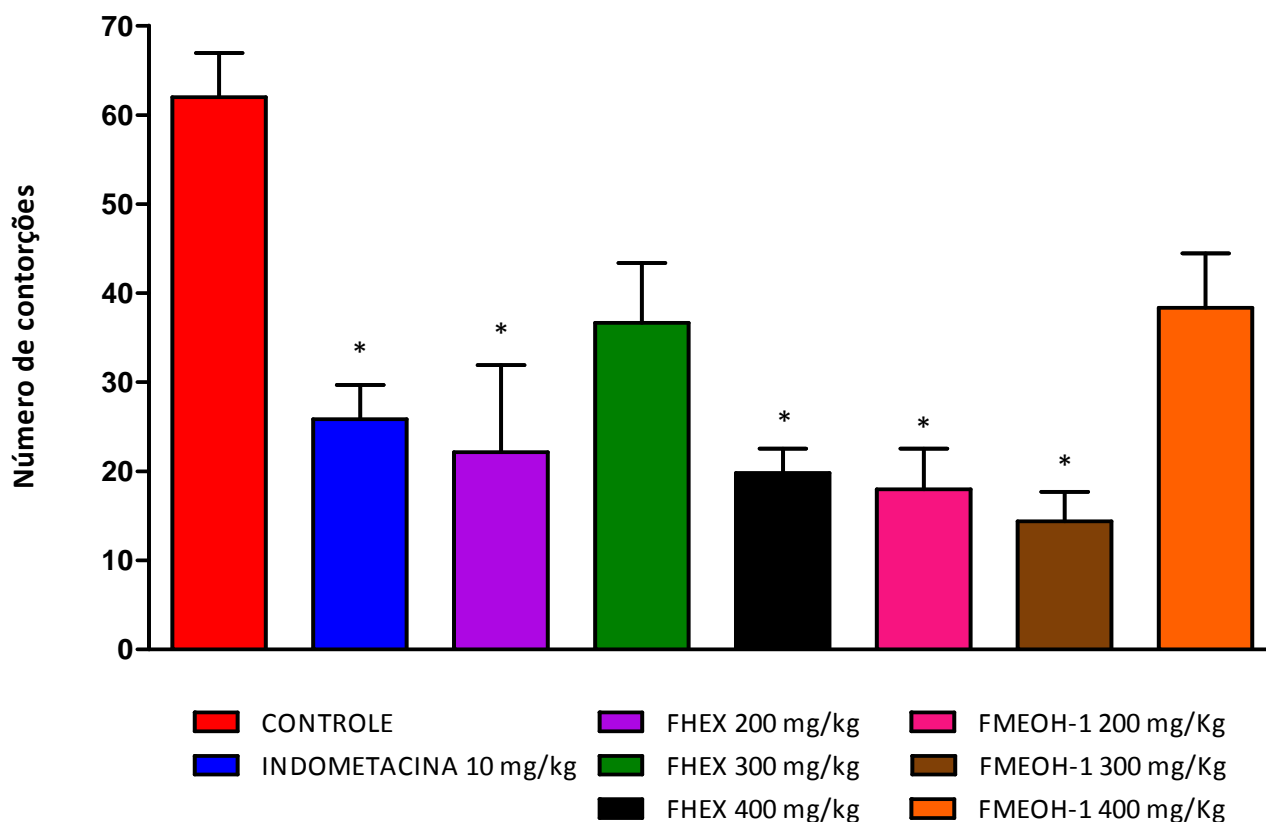


Figura 15: Efeito da administração oral das frações FMEOH-1 e FHEX após partição do EEB de *Protium spruceanum* (HEX/MeOH:H₂O 9:1) no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos. FHEX e FMEOH-1 (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais totais. (média ± E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao grupo controle

Após o fracionamento HEX/MEOH:H₂O, ambas as frações FHEX e FMEOH-1 apresentaram atividade antinociceptiva estatisticamente significativa. Foi possível observar que a fração FMEOH-1 quando administrada nas doses de 200 e 300 mg/kg causou uma redução no número total de contorções abdominais, comparado ao grupo controle.

Entretanto, na dose de 400 mg/kg tal atividade não foi observada comparado ao grupo controle.

A fração FHEX apresentou atividade antinociceptiva estatisticamente significativa quando administrada nas doses 200 e 400 mg/kg. Entretanto, não foi observada atividade antinociceptiva para a dose de 300 mg/kg. A atividade antinociceptiva observada na fração FHEX pode ser atribuída a presença da mistura α e β -amirinas isolada da fração.

Possivelmente, na fração FMEOH-1, existem substâncias que antagonizam a ação de substâncias analgésicas e assim quando administrada na dose de 400mg/kg não apresente atividade estatisticamente significativa.

A manifestação da dor induzida por ácido acético em camundongos se dá pela contorção abdominal seguida do estiramento das patas traseiras.

Uma vez que dor e nocicepeção são conceitos distintos, o componente nociceptivo pode ser exatamente o mesmo, mas o componente afetivo acaba sendo diferente (RANG et al., 2007). Os animais tratados com FHEX na dose de 300 mg/kg podem ter manifestado a dor, por meio das contorções abdominais, por serem mais sensíveis ao estímulo, uma vez que a reação subjetiva da dor pode variar de indivíduo para indivíduo. Apesar de não apresentarem redução estatisticamente significativa no número de contorções, os animais desse grupo contorceram-se menos, comparado ao grupo controle.

A fração FMEOH-1 apresentou atividade antinociceptiva estatisticamente significativa e foi submetida ao refractionamento e as frações obtidas foram avaliadas. Os resultados obtidos estão representados na tabela 21 e foram expressos pela média \pm E.P.M..

Tabela 21: Perfil do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético para FDCM, FMEOH-F e PDCM

Grupo/Tempo	Número de Contorções					
	0min a 4min59s	5min a 9min59s	10min a 14min59s	15min a 19min59s	20min a 24min59s	Total
Controle	4,5±1,15	14,7±0,96	16,6±1,21	12,5±1,19	11,1±1,09	59,3±3,04
Indometacina	0,1±0,09	4,5±0,73	8,0±0,86	6,8±0,69	6,6±0,67	26,4±2,29*
FDCM 200 mg/kg	0,0±0,0	7,7±0,87	7,9±1,35	7,1±1,64	7,9±1,72	30,6±4,51*
FDCM 300 mg/kg	2,4±0,84	8,0±2,60	6,3±1,91	4,4±1,05	3,3±1,10	24,3±6,99*
FDCM 400 mg/kg	0,4±0,30	7,7±3,08	9,4±3,28	8,1±2,56	6,6±2,14	32,3±10,88*
FMEOH-F 200 mg/kg	0,7±0,57	9,0±2,01	7,6±1,69	6,6±1,34	5,1±1,92	29,0±6,66*
FMEOH-F 300 mg/kg	1,9±1,26	8,9±2,65	8,7±2,90	7,3±2,06	4,1±1,47	30,9±8,94*
FMEOH-F 400 mg/kg	1,9±0,69	11,6±2,24	8,5±1,87	7,8±2,09	6,9±1,72	36,6±7,89
PDCM 200 mg/kg	0,4±0,26	8,0±2,64	10,9±2,18	9,4±1,95	7,3±1,16	35,9±6,71
PDCM 300 mg/kg	1,9±0,80	15,3±2,96	12,4±1,00	13,0±1,38	10,0±1,96	52,6±4,97
PDCM 400 mg/kg	0,7±0,36	10,4±1,38	12,0±1,05	8,1±1,37	8,0±1,38	39,3±3,91

Administração das frações FDCM, FMEOH-F e PDCM (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais a cada 5 minutos e o número de contorções totais expressos pela média ± E.P.M.. ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 comparado ao grupo controle

Na Figura 16 estão representadas as médias totais de contorções abdominais para as frações FMEOH-F, PDCM e FDCM nas doses 200, 300 e 400 mg/kg e para indometacina (10 mg/kg) comparado ao grupo controle.

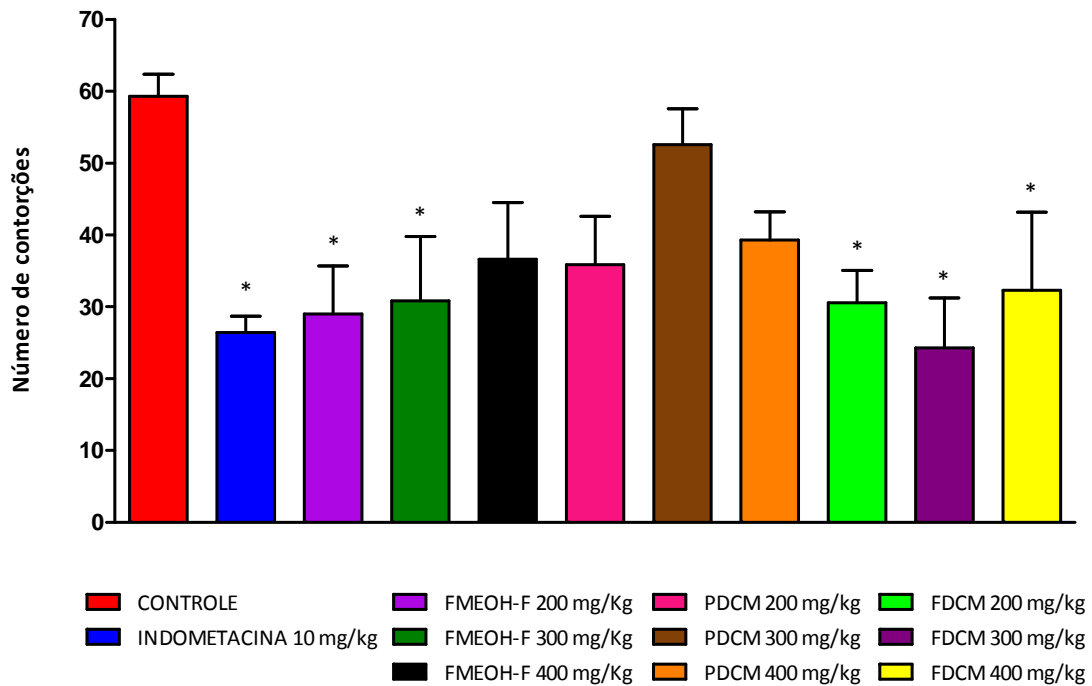


Figura 16: Efeito da administração oral das frações FMEOH-F, PDCM e FDCM após partição da FMEOH-1 no número de contorções induzidas por ácido acético em camundongos. FMEOH-F, PDCM e FDCM (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes da administração de ácido acético (0,6 %, v.ip., 0,2 mL/animal). Dados representam o número de contorções abdominais totais. (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao grupo controle

A análise dos resultados demonstrou que o precipitado obtido deste refractionamento (PDCM) não foi capaz de promover redução estatisticamente significativa no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em nenhuma das doses administradas.

A fração FMEOH-F administrada nas doses de 200 e 300 mg/kg apresentou redução estatisticamente significativa no número de contorções abdominais comparado ao grupo controle. Entretanto, não houve redução estatisticamente significativa do número de contorções quando administrada na dose de 400 mg/kg.

Este resultado, corrobora com o resultado observado para FMEOH-1 e sugere que existem substâncias que antagonizam a ação daquelas que possuem atividade antinociceptiva.

A análise dos resultados obtidos para a fração FDCM mostrou que, quando administrada nas doses de 200 e 300 mg/kg, ocorre uma redução estatisticamente significativa no número de contorções abdominais, comparado ao grupo controle. Entretanto, quando administrada na dose de 400 mg/kg, não provocou redução estatisticamente significativa do número de contorções.

4.2.3.2 Método de Placa Quente

Inicialmente o EEB das folhas de *Protium spruceanum* foi submetida a avaliação da atividade antinociceptiva central pelo método de placa quente e os resultados obtidos encontram-se na Tabela 22. Na tabela estão representados os TL's em segundos (s) nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos e são expressos pela média \pm E.P.M..

Tabela 22: Resposta da administração de EEB no método de placa quente

Grupos	Tempo				
	0 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
Controle	2,9 \pm 0,19	5,0 \pm 0,61	5,3 \pm 1,63	5,4 \pm 1,88	5,6 \pm 0,78
Morfina	3,1 \pm 0,89	8,4 \pm 1,35	15,0 \pm 3,14*	20,6 \pm 1,72*	15,5 \pm 1,69*
EEB 200 mg/kg	3,0 \pm 0,34	4,7 \pm 1,75	5,0 \pm 1,32	8,2 \pm 1,81	8,3 \pm 2,52
EEB 300 mg/kg	2,5 \pm 0,17	6,5 \pm 1,13	7,2 \pm 0,92	9,5 \pm 0,76	8,7 \pm 1,40
EEB 400 mg/kg	4,1 \pm 0,85	6,7 \pm 1,26	12,8 \pm 1,24 ^o	6,6 \pm 2,55	7,1 \pm 2,31

Administração do EEB das folhas de *Protium spruceanum* (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6). O TL foi determinado antes do teste e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das doses. Dados representam os TL em s (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo morfina e ^op<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo EEB 400 mg/kg.

Na Figura 17 estão representados os resultados de nocicepção obtidos através do método de placa quente para os grupos de animais tratados com EEB (200, 300 e 400 mg/kg), morfina (7,5 mg/kg) e controle.

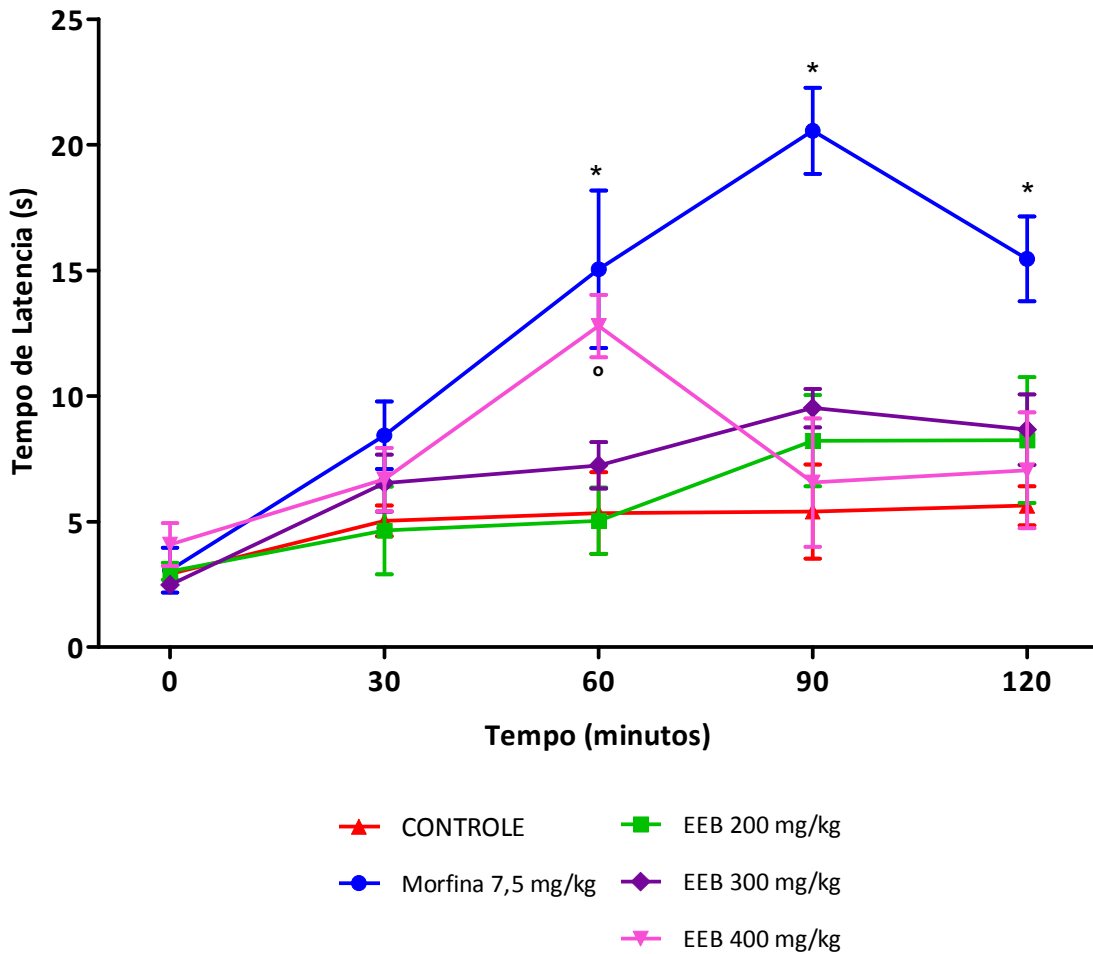


Figura 17: Efeito da administração oral do EEB de *Protium spruceanum* no tempo de latência para o método de placa quente em camundongos. EEB (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5% em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) foram administrados 30 minutos antes de os animais serem colocados sobre a placa aquecida a $56^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$. O TL foi determinado antes do teste e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das doses. Dados representam os TL em s (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao TL inicial para o grupo morfina e ^o $p < 0,05$ em relação ao TL inicial para o grupo EEB 400 mg/kg

Analisando esses resultados foi possível observar que a morfina apresentou atividade antinociceptiva estatisticamente significativa nos tempo 60, 90 e 120 minutos com o considerável aumento do TL comparado ao TL inicial.

Atividade antinociceptiva também foi observada quando foi administrado EEB 400 mg/kg. O TL inicial aumentou significativamente em 60 minutos. Entretanto, nas demais doses não foi possível observar atividade antinociceptiva.

As frações obtidas após o fracionamento do EEB em Hex/MeOH:H₂O (9:1) foram avaliadas frente a atividade antinociceptiva central pelo método de placa quente e os resultados dos TL's estão apresentados na Tabela 23, expressos pela média \pm E.P.M..

Tabela 23: Resposta da administração de FMEOH-1 e FHEX no método de placa quente

Grupos	Tempo				
	0 minutos	30 minutos	60 minutos	90 minutos	120 minutos
Controle	2,9 \pm 0,19	5,0 \pm 0,61	5,3 \pm 1,63	5,4 \pm 1,88	5,6 \pm 0,78
Morfina	3,1 \pm 0,89	8,4 \pm 1,35	15,0 \pm 3,14*	20,6 \pm 1,72*	15,5 \pm 1,69*
FMEOH-1 200 mg/kg	5,6 \pm 1,33	4,6 \pm 1,19	5,8 \pm 2,36	8,0 \pm 1,72	4,5 \pm 1,00
FMEOH-1 300 mg/kg	3,7 \pm 1,14	3,6 \pm 0,57	4,3 \pm 0,58	3,7 \pm 1,28	4,5 \pm 1,05
FMEOH-1 400 mg/kg	5,6 \pm 1,19	5,5 \pm 1,42	4,8 \pm 1,67	5,4 \pm 1,41	4,2 \pm 0,90
FHEX 200 mg/kg	3,8 \pm 0,80	8,2 \pm 1,16	7,6 \pm 2,02	8,4 \pm 1,85	3,6 \pm 0,43
FHEX 300 mg/kg	2,8 \pm 0,43	5,0 \pm 0,85	8,3 \pm 1,33	8,7 \pm 0,86	4,0 \pm 0,82
FHEX 400 mg/kg	3,5 \pm 1,00	7,5 \pm 1,43	9,5 \pm 1,05	16,0 \pm 3,45 ^o	5,9 \pm 0,88

Administração das frações FMEOH-1 e FHEX (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6). O TL foi determinado antes do teste e nos tempos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das doses. Dados representam os TL em s (média \pm E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo morfina e ^op<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo FHEX 400 mg/kg.

Na Figura 18 estão representados os resultados para o método de placa quente para FHEX (200, 300 e 400 mg/kg), morfina (7,5 mg/kg) e grupo controle (Figura 18-A) e para FMEOH-1 (200, 300 e 400 mg/kg), morfina (7,5 mg/kg) e grupo controle (Figura 18-B).

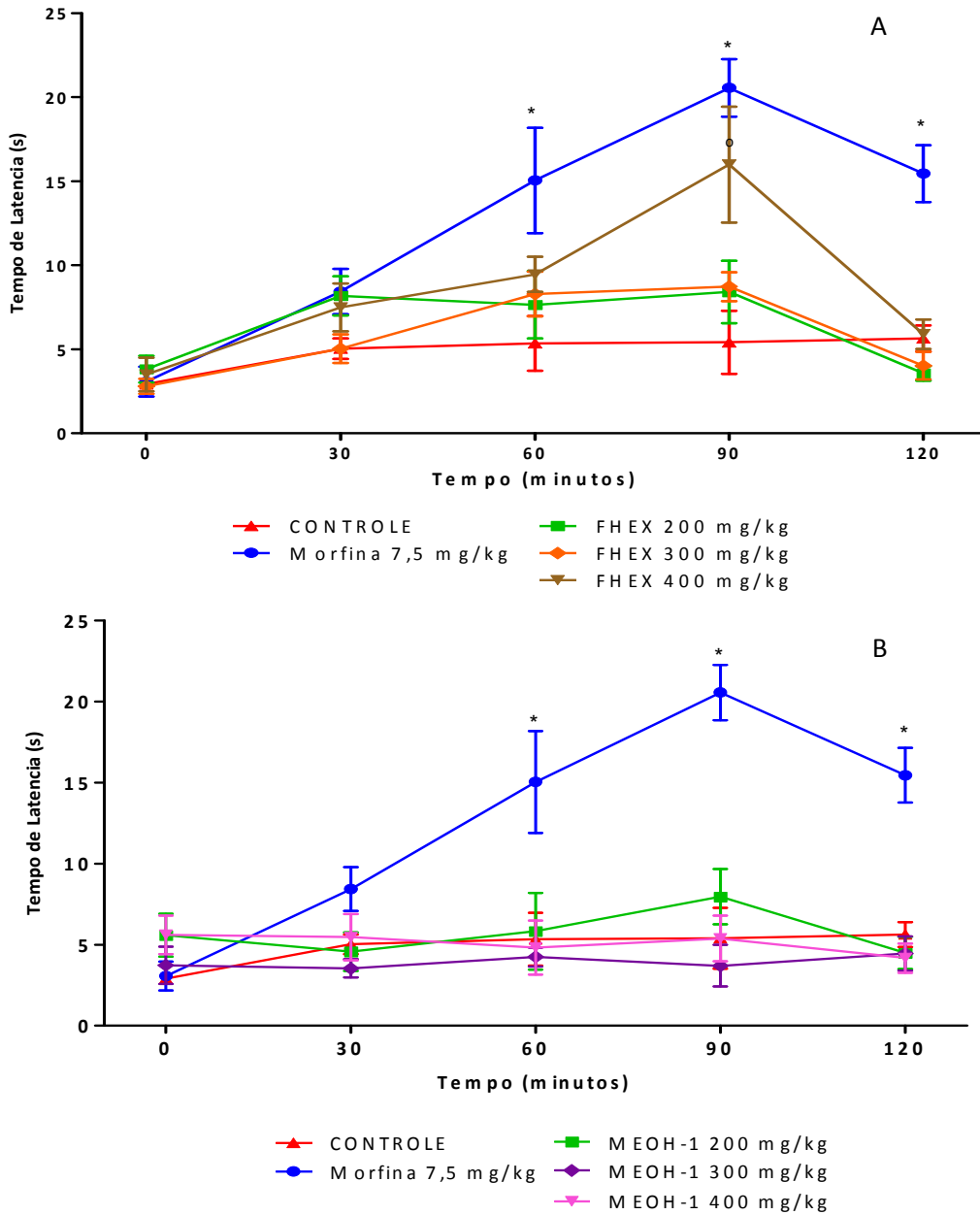


Figura 18: Efeito da administração oral das frações FMEOH-1 e FHEX após partição do EEB de *Protium spruceanum* (HEX/MeOH:H₂O 9:1) no tempo de latência para o método de placa quente em camundongos. A - FHEX (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) B – FMEOH-1 (200, 300 e 400 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6). As doses foram administradas 30 minutos antes de os animais serem colocados sobre a placa aquecida a 56 °C ± 2 °C. O TL foi determinado antes do teste e 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das doses. Dados representam os TL em s (média ± E.P.M.). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo morfina e °p<0,05 em relação ao TL inicial para o grupo FHEX 400 mg/kg

Analisando os resultados obtidos para o método de placa quente para as frações FMEOH-1 e FHEX, foi observado um aumento estatisticamente significativo no TL para a FHEX administrada na dose de 400 mg/kg em 90 minutos comparado ao TL inicial. Este resultado também foi observado para morfina (7,5 mg/kg) utilizada como padrão que promoveu o aumento estatisticamente significativo do TL inicial comparado aos TL's nos tempos 60, 90 e 120 minutos.

A fração FMEOH-1 não apresentou atividade antinociceptiva central estatisticamente significativa.

As frações obtidas da partição da FMEOH-1 foram submetidas ao método de placa quente, entretanto, não apresentaram atividade antinociceptiva central estatisticamente significativa e os resultados não estão aqui apresentados.

Apesar de apenas o EEB e a FHEX ter apresentado atividade antinociceptiva central estatisticamente significativa e de as demais frações do EEB não terem apresentado esta atividade para o método de placa quente, durante o experimento, foi observado que as patas posteriores dos animais tratados com EEB, FHEX e FMEOH-1, após 120 minutos, estavam consideravelmente menos inflamadas quando comparadas aos grupos controle e morfina. Sugerindo que essas frações possuíam atividade antiinflamatória.

4.2.3.3 Método de Formalina

A Tabela 24 abaixo são mostrados os resultados obtidos para a análise da atividade antinociceptiva avaliada pelo Método Nocicepção Induzida por Formalina.

Tabela 24: Resposta da administração de EEB das folhas de *Protium spruceanum* e das frações FMEOH-1 e FHEX para o método de formalina

Grupos	Fase I	Fase II
Controle	115,3±12,14	66,1±17,01
Dipirona 200 mg/kg	13,0±3,69*	1,6±0,83*
Morfina 7,5 mg/kg	3,0±1,45*	0,0±0,00*
Indometacina 10 mg/kg	101,3±18,75	30,6±10,90
EEB 150 mg/kg	81,2±8,14	11,0±5,77*
FHEX 150 mg/kg	82,8±8,55	2,2±1,13*
FMEOH-1 150 mg/kg	120,0±13,14	29,3±11,95

Administração do EEB e das frações FMEOH-1 e FHEX das folhas de *Protium spruceanum* (150 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), dipirona (fármaco padrão, 200 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da administração do agente nociceptivo (formalina, 1,5 %, 0,03 mL/pata). Dados representam o tempo de irritação em s (média ± E.P.M.) na fase I (0 a 5 minutos) e na fase II (20 a 25 minutos). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. *p<0,05 em relação ao TL inicial

Na Figura 19 estão representados os resultados da comparação entre os TI do extrato e das frações com os grupos controle e tratados com fármacos padrão (indometacina, dipirona e morfina). Em (A) observam-se os resultados para a fase I e em (B) para a fase II.

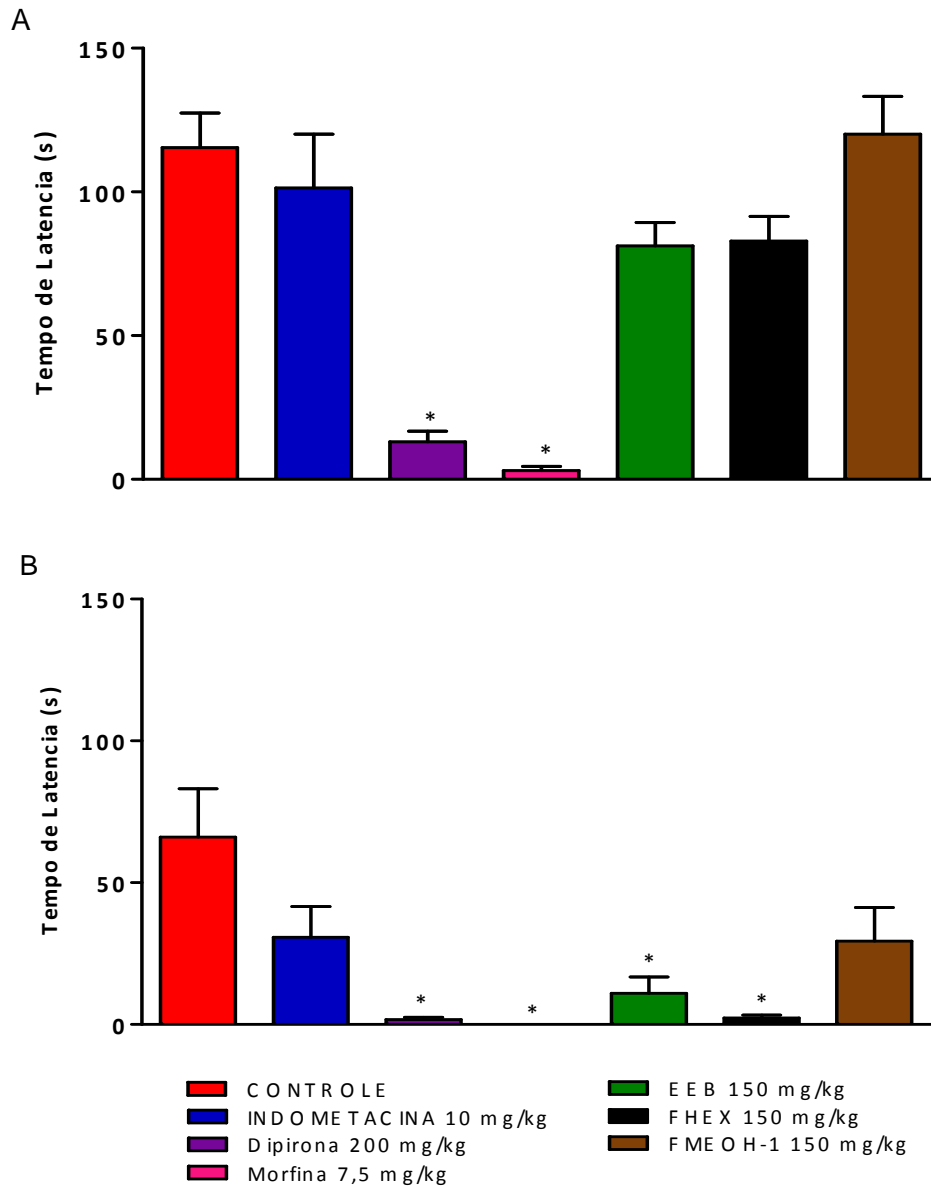


Figura 19: Efeito da administração oral do extrato e das frações de *Protium spruceanum* sobre o tempo de irritação para o método de nocicepção induzida por formalina. EEB, FMEOH-1 e FHEX Veículo (150 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), morfina (fármaco padrão, 7,5 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6), dipirona (fármaco padrão, 200 mg/kg, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) e controle (Tween 80 a 5 % em solução fisiológica, v.o., 0,2 mL/animal, n=6) 30 minutos antes da administração do agente nociceptivo (formalina, 1,5 %, 0,03 mL/pata). Dados representam o tempo de irritação em s (média \pm E.P.M.). A – fase I (0 a 5 minutos) e B – fase II (20 a 25 minutos). ANOVA e Teste de Comparações Múltiplas de Bonferroni. * $p < 0,05$ em relação ao TL inicial

O comportamento nociceptivo induzido por formalina é caracterizado pela estimulação de fibras sensitivas aferentes primárias induzindo irritação na pata do animal. Perante esta irritação, o animal responde lambendo, mordendo ou agitando a pata após a

injeção de formalina. A resposta nociceptiva inicial, que ocorre nos 5 primeiros minutos após a injeção de formalina, é conhecida como fase I, “*early-phase*” ou ainda fase neurogênica. Esta fase representa a resposta à dor tônica. Já a resposta de fase II, também conhecida como fase tardia, fase inflamatória ou “*late-phase*”, ocorre de 15 a 30 minutos após a injeção de formalina e representa a resposta a dor inflamatória (SOLDI et al., 2008).

Na primeira fase, os receptores envolvidos para ação antinociceptiva são os do sistema opióide, já na segunda fase, a inibição da enzima cicloxigenase é responsável pela diminuição do efeito nociceptivo (HOLANDA PINTO et al., 2008).

Fármacos que atuam principalmente como analgésicos de ação central são capazes de inibir ambas as fases, entretanto, aqueles de ação periférica, inibem apenas a segunda fase (ROSELAND et al., 1990).

Foi possível observar que apenas morfina e dipirona foram capazes de reduzir de maneira estatisticamente significativa a resposta nociceptiva inicial (Fase I), quando comparados com o grupo controle. Entretanto, nem o EEB nem as frações FMEOH-1 e FHEX apresentaram atividade antinociceptiva na Fase I.

Na Fase II, morfina e dipirona reduziram significativamente a resposta nociceptiva, comparado com o grupo controle. Efeito semelhante foi observado para EEB e FHEX.

A indometacina não apresentou atividade em nenhuma das fases, posto possui atividade substancialmente antiinflamatória.

Holanda Pinto e colaboradores (2008) verificaram que o pretatamento com α e β -amirinas produziu pronunciado efeito antinociceptivo pelo método de capsaicina e na segunda fase do método de formalina. Esse efeito analgésico pode estar relacionado com a liberação de mediadores da dor como neuropeptídios e prostaglandinas (HOLANDA PINTO et al., 2008).

A busca de substâncias com analgesia opióide periférica é, sem dúvida, de relevância clínica, principalmente considerando que a terapêutica opióide sistêmica é dificultada pela presença constante de efeitos colaterais centrais (HOLANDA PINTO et al., 2008). Os resultados de fase I do método de formalina corroboram as pesquisas de Otuki e colaboradores (2005) e sugerem que FHEX, rica em α e β -amirinas, não possui ação analgésica central. Os resultados obtidos para a fase II, juntamente com os resultados obtidos para o método de contorções abdominais, indicam que a FHEX apresenta atividade

analgésica periférica. Estudos realizados por Holanda Pinto e colaboradores (2008) indicam que a ação analgésica de α e β -amirinas na fase II do método de formalina pode ser revertida pela presença de naloxana, sugerindo que esta substância poderia até mesmo ter uma ação direta sobre os receptores opióides (HOLANDA PINTO et al., 2008), entretanto, ainda não existem estudos mais aprofundados que justifiquem essa contradição. Desta forma, a atividade analgésica de FHEX, se deve a presença da mistura α e β -amirinas isolada da fração.

5- CONCLUSÕES

Através do estudo fitoquímico do EEB das folhas de *Protium spruceanum* foi observada a presença de diferentes classes de metabólitos secundários (taninos, flavonóides, fenóis, terpenos, saponinas, esteróides, xantonas e cumarinas).

A partir do uso de técnicas cromatográficas clássicas e por análises espectrométricas foi possível isolar e identificar a mistura de α e β -amirinas como constituinte majoritário da FHEX. Das frações FDCM e FMEOH-F foi possível isolar três flavonóides que encontram-se em fase de identificação.

Os ensaios de propriedade antioxidante mostraram o potencial antioxidante do EEB e das frações polares que pode ser atribuído aos compostos fenólicos, principalmente flavonóides, no extrato, que se concentram principalmente nas frações FDCM e FMEOH-F após o fracionamento.

O EEB das folhas de *Protium spruceanum* apresenta baixa toxicidade aguda.

Resultados promissores de atividade antiinflamatória foram observados tanto para o EEB quanto para as frações. Na FHEX esta atividade está relacionada à presença da mistura α e β -amirinas, triterpenos de reconhecida ação antiinflamatória, isolada da fração. Nas frações FMEOH-1, FDCM e FMEOH-F esta atividade pode estar relacionada com a presença de um elevado teor de flavonóides.

A análise conjunta dos resultados obtidos pelos três métodos utilizados para avaliação da atividade analgésica sugere que apenas a fração FHEX possui atividade antinociceptiva significativa de origem central e periférica relevante atribuída à presença da mistura de α e β -amirinas.

Os resultados do método de contorções abdominais para as frações polares e de polaridade intermediária, sugerem que as frações FMEOH-1, FDCM e FMEOH-F apresentam atividade analgésica periférica.

Essencialmente, a mistura triterpênica de α e β -amirina é a responsável pelas atividades antiinflamatória e analgésica da FHEX e contribui para as atividades biológicas do EEB das folhas de *Protium spruceanum*.

6- REFERÊNCIAS

- ABADDIE, C.; TAYLOR, B. K.; PETERSON, M. A.; BASBAUM, A. I. Differential contribution of the two phases of the formalin test to the pattern of c-fos expression in the rat spinal cord: studies with remifentanil and lidocaine. *Pain*, 69(1-2), 101-110, 1997.
- ACEVEDO-BOGADO, C. E.; BINS-ELY, J.; D'ACAMPORA, A. J.; NEVES, R. E. Efeito da hialuronidase na sobrevida de retalhos cutâneos em ratas. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 17 (1), 14-16, 2002.
- AGRAWAL, P. K. *Carbon-13 NMR of Flavonoids*. Amsterdam, 1989.
- AHMADIANI, A.; FERREIDONI, M.; SEMNANIAN, S.; KAMALINEJAD, M.; SAREMI, S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Sambucus elubus* rhizome extract in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 61, 229-235, 1999.
- ALMEIDA, E. X.; CONSERVA, L. M.; LEMOS, R. P. L. Coumarins, coumarinolignoids and terpenes from *Protium heptaphyllum*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 30(7), 685-687, 2002.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*. Florida, Taylor & Francis, 2006.
- ARAGÃO, G. F.; CARNEIRO, L. M. V.; JUNIOR, A. P. F.; VIEIRA, L. C.; BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. A possible mechanism for anxiolytic and antidepressant effects of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. *Pharmacology, Biochemistry and behavior*, 85(4), 827-834.
- ARNOUS, A. H.; SANTOS, A. S.; BEINER, R. P. C. Plantas medicinais de uso caseiro: conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. *Revista Espaço para a Saúde*, 6(2), 1-6, 2005.
- BANDEIRA, P. N.; LEMOS, T. L. G.; COSTA, S. M. O.; DOS SANTOS, H. S. Obtenção de derivados da mistura triterpenoídica α - e β -amirina. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2), 204-208, 2007

- BANDEIRA, P. N.; PESSOA, O. D. L.; TREVISAN, M. T. S.; LEMOS, T. L. G. Metabólitos secundários de *Protium heptaphyllum* March. *Química Nova*, 25(6B), 1078-1080, 2002
- BANNO, N.; AKIHISA, T.; YASUKAWA, K.; TOKUDA, H.; TABATA, K.; NAKAMURA, Y.; NISHIMURA, R.; KIMURA, Y.; SUZUKI, T. Anti-inflammatory activities of the triterpene acids from the resin of *Boswellia carteri*. *Journal of Ethnopharmacology*, 107(2), 249-253, 2006
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. *Química Nova*, 29(1), 113-123, 2006
- BERTAN, L. C.; TANADA-PALMU, P. S.; SIANI, A. C.; GROSSO, C. R. F. Effect of fatty acids and 'Brazilian elemi' on composite films based on gelatin. *Food Hydrocolloids*, 19(1), 73-82, 2005
- BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature*, 181, 1199-1200, 1958.
- BLOKHINA, O.; FAGERSTEDT, K. V. Oxidative metabolism, ROS and NO under oxygen deprivation. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48, 359-373, 2010.
- BONOLI, M.; VERARDO, V.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Antioxidant phenols in Barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(16), 5195-5200, 2004.
- BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica*. 11ª Ed. Editora McGraw-Hill, 1821p, Rio de Janeiro, 2006.
- CARRETERO, M. E.; LÓPEZ-PÉREZ, J. L.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; TILLET, S.; ISRAEL, A.; NOGUERA, P. B. Preliminary study of the anti-inflammatory activity of hexane extract and fractions from *Bursera simaruba* (Linneo) Sarg. (Burseraceae) leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 116(1), 11-15, 2008.

- CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 19(4), 860-864, 2009.
- CHANG, C.; YANG, M.; WEN, H.; CHERN, J. Estimation of total flavonoids content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*, 10(3), 178-182, 2002
- CITÓ, A. M. G. L.; COSTA, F. B.; LOPES, J. A. D.; OLIVEIRA, V. M. M.; CHAVES, M. H. Identificação de constituintes voláteis de frutos e folhas de *Protium heptaphyllum* Aubl (March). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais de Botucatu*, 8(4), 4-7, 2006
- CRAY, C.; ZAIAS, J.; ALTMAN, N. H. Acute phase response in animals: a review. *Comparative Medicine*, 59(6), 517-526, 2009.
- CRUZ-CAÑIZARES, J. D.; DOMÉNECH-CARBÓ, M.; GIMENO-ADELANTADO, J.; MATEO-CASTRO, R.; MATEO-CASTRO, R.; BOSCH-REIG, F. Study of Burseraceae resins used in binding media and varnishes from artworks by gas chromatography-mass spectrometry and pyrolysis-gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1093 (1-2), 177-194, 2005.
- DA CUNHA, A. P.; DA SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*, Serviço de Educação e Bolsas, Fundação Calouste Gulberkian, Lisboa, p. 701, 2003.
- DA SILVA, R. R.; DE OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J.; LEÃO, M. A. Efeito de flavonóides no Mmetabolismo do ácido araquidônico. *Medicina*, 35, 127-133, 2002.
- DE ALBUQUERQUE, U. P.; DE MEDEIROS, P. M.; DE ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M.; LINS-NETO, E. M. F.; DE MELO, J. G.; DOS SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. *Journal of Ethnopharmacology*, 114 (3), 325-354, 2007.
- DE FRANCISCHI, J. N. *A Farmacologia em Nossa Vida* Editora UFMG, p. 140, Belo Horizonte, 2005.

- DE SOUZA, G. H. Investigação das atividades biológicas e determinação da relação estrutura-atividade de alguns derivados obtidos por síntese parcial ou total de cubebina e outras lignanas majoritárias isoladas de *Piper cubeba* L., Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005.
- DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. A., ET AL. A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians. *Journal of Ethnopharmacology*, 77(1), 91- 98, 2001.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *Journal of Pathology*, 104(1), 15-29, 1971.
- DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2), 161-174, 1977.
- EBADI, M. S. *Pharmacodynamic Basis of Herbal Medicine*, 2ed., CRC Press, Boca Raton, Filadelfia, 734 p. , 2006.
- EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 107(3), 385-393, 1953.
- ERDEMOGLU, N.; TURAN, N. N.; AKKOL, E. K.; SENER, B.; ABACIOGLU, N. Estimation of anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of *Arctium minus* (Hill) Bernh. ssp. minus. *Journal of Ethnopharmacology*, 121(2), 318-323, 2009.
- FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 43 (1), 61-68, 1997.
- FERREIRA, S. H. A new method for measuring variations of rats paw volumes. *Journal Pharmacy and Pharmacology*, 31(9), 648, 1979.

- FOURNET, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. Biological and chemical studies of *Pera benesis*, a Bolivian plant used in folk medicine as a treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Ethnopharmacology*, 37(2), 159-164, 1992
- FRIDOVICH, I. Oxygen radicals, hydrogen peroxyde and oxygen toxicity. In: Pryor, W. *Free radicals in Biology* Vol. I Academic Press, New York, pp. 239-277, 1977
- GERTSCH, J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *Journal of Ethnopharmacology*, 122, 177-183, 2009.
- GOTTLIEB, O. R.; KAPLAN, M. A. C.; BORIN, M. R. M. B. *Biodiversidade, um enfoque químico-biológico*. Ed. UFRJ, Rio de Janeiro, 267pp, 1996
- GUZZO, L. S. Avaliação de atividades farmacológicas de diferentes espécies de *Lychnophora* utilizadas pela população. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, Brasil, 118pp, 2007
- GUZZO, L. S.; SAÚDE-GUIMARÃES, D. A.; SILVA, A. C. A.; LOMBARDI, H. N.; GRABE-GUIMARÃES, A. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. *Journal of Ethnopharmacology*, 116 (1), 120-124, 2008
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Anti-inflammatory effect of alpha, beta-Amyrin, a pentacyclic triterpene from *Protium heptaphyllum* in rat model of acute periodontitis. *Inflammopharmacology*, 16(1), 48-52, 2008.
- HOLANDA PINTO, S. A.; PINTO, L. M.; GUEDES, M. A.; CUNHA, G. M.; CHAVES, M. H.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antinoceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. *Phytomedicine*, 15(8), 630-634, 2008.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *Journal of Neuroscience Methods*, 14(1), 69-76, 1985.

- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1), 103-114., 1987.
- KHALID, S. A. Chemistry of the Burseraceae. In: WATERMAN, P.G.; GRUNDUM, M. F. *Chemistry and Chemical Taxonomy of the Rutales* Academic Press, New York, pp. 281-299, 1983.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, J. Acetic acid for analgesic screening. *Federal Proceedings*, 18, 412-417, 1959.
- LEE, I. O.; JEONG, Y. S. Effects of different concentrations of formalin on paw edema and pain behaviors in rats. *Journal of Korean Medical Science*, 17, 81-85, 2002.
- LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; OTUKI, M. F.; CALIXTO, J. B.; YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; MONACHE, F. D. Three new triterpenes from the resinous bark of *Protium kleinii* and their antinociceptive activity. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(3b), 2005.
- LIMA, M. P.; PINTO, D. S.; DE CARVALHO, L. E.; RIBEIRO, J. E. L. S.; MARQUES, M. O. M.; FACANALI, R. Análise dos óleos voláteis de *Protium decandrum* da Reserva de Ducke - AM. In: *Anais da 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2006.
- LITCHFIELD JR., J. T.; WILCOXON, F. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96(2), 99-113.(1949).
- LOBO-FARIA, P. C. Estratégias adaptativas de espécies arbóreas típicas de ambiente com solo hidricamente saturado: uma abordagem morfológica, bioquímica e ecofisiológica. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.
- MACHADO, L. B.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. *Flavour and Fragrance Journal*, 18, 338-341, 2003.
- MAGALHÃES, A.; ZOGHBI, M. D.; SIANI, A. C. 5-Methoxypropacin, a novel

- coumarinolignoid from *Protium unifoliolatum*. *Natural Product Research*, 20(1), 43-46; 2006.
- MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³C NMR spectra of pentacyclic triterpenoids - a compilation and some salient features. *Phytochemistry*, 37(6), 1527-1575, 1994.
- MAIA, R. M.; BARBOSA, P. R.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F.; FASCIO, M. Triterpenos da resina de *Protium heptaphyllum* March (Burseraceae): caracterização em misturas binárias. *Química Nova*, 23(5), 623-626, 2000.
- MARKHAM, K. R. *Techniques of Flavonoid Identification*. Springer, New York, 1982.
- MATOS, F. J. A. *Introdução à fitoquímica experimental*. Editora da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 124pp, 1988
- MEDEIROS, R.; OTUKI, M. F.; AVELLAR, M. C. W.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene α -amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-*O*-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *European Journal of Pharmacology*, 559(2-3), 227-235, 2007.
- MILLER, R. S.; LNSEL, P. A.; MELNON, L. K. *Inflammatory disorders*. In: L. K. MELNON, H. F. MORELLI (Eds), *Clinical Pharmacology*, pp, 657-708 Macmillan Publishing Co. Inc., 2^a Ed., New York, 1978
- NATURA/Brasil. Natura Ekos - Viva sua Natureza. <http://www.natura.net/port/hotsite/ekos/ativos/perguntas.asp> acessado em 21 de março de 2010a.
- NATURA/Brasil. Natura Ekos - Viva sua Natureza. <http://www.natura.net/port/hotsite/ekos/ativos/release.asp> acessado em 21 de março de 2010b.
- OLIVEIRA, F. A. Estudo das propriedades farmacológicas da resina de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. e de seus principais constituintes, mistura de alpha- e beta-amirina. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.
- OLIVEIRA, F. A.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R.C.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R.

- M.; MAIA, J. L.; BRITO, G. A. A. C.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Protective effect of α - and β -amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 98(1-2), 103-108, 2005.
- OLIVEIRA, F. A.; COSTA, C. L. S.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; CAVALCANTE, I. J. M.; LIMA, A. F.; LIMA JR., R. C. P.; SILVA, R. M.; CAMPOS, A. R.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Attenuation of capsaicin-induced acute and visceral nociceptive pain by α - and β -amyrin, a triterpene mixture isolated from *Protium heptaphyllum* resin in mice. *Life Sciences*, 77(23), 2942-2952, 2005.
- OLIVEIRA, F. A.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; CORDEIRO, W. M.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Pentacyclic triterpenoids, α - β -amyryns, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 78(4), 719-725, 2004b.
- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA JR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from *Protium heptaphyllum* in mice and rats. *Pharmacological Research*, 49(2), 105-111, 2004a.
- OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; DELLE MONACHE, F.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. *Life sciences*, 69(19), 2225-2236. (2001).
- OTUKI, M. F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and α -amyryn pentacyclic triterpene. *European Journal of Pharmacology*, 507(1-3), 253-259, 2005
- PEREIRA, F. E. L. *Inflamações*. In: G. B. FILHO (Ed.), Patologia Geral, pp. 130-172, Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

- PESSUTO, M. B.; DA COSTA, I. C.; DE SOUZA, A. B.; NICOLI, F. M.; DE MELLO, J. C. P.; PETEREIT, F.; LUFTMANN, H. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. *Química Nova*, 32(2), 412-416, 2009.
- PONCE, M. A.; SCERVINO, J. M.; ERRA-BALSELLS, R.; OCAMPO, J. A.; GODEAS, A. M. Flavonoids from shoots, roots and roots exudates of *Brassica alba*. *Phytochemistry*, 65, 3131-3134, 2004)
- PONTES, W. J. T.; DE OLIVEIRA, J. C. G.; DA CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C., DE OLIVEIRA, J. V.; BARROS, R.; SCHWARTZ, M. O. E. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). *Acta Amazonica*, 37(1), 103-110, 2007
- PONTES, W. J. T.; DE OLIVEIRA, J. C. S.; DA CÂMARA, C. A. G.; LOPES, A. C. H. R.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; DE OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Composition and acaricidal activity of the resin's essential oil of *Protium bahianum* Daly against two spotted spider mite (*Tetranychus urticae*). *Journal of Essential oil Research*, 19, 379-383, 2007
- RAMOS, M. F. S.; GUIMARÃES, A. C.; SIANI, A. C. Volatile monoterpenes from the oleoresin of *Trattinnickia rhoifolia*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 31(3), 309-311, 2003.
- RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Rang & Dale Farmacologia* Elsevier, 6 ed., Rio de Janeiro, 829p., 2007.
- ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. R. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. (*Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology*), Editora Premier, São Paulo, Brasil, 1997.
- ROSEIN, G. E.; MIYAMOTO, S.; BECHARA, E.; DI MASCIO, P.; MARTINEZ, G. R. Oxidação de proteínas por oxigênio singlete: mecanismos de dano, estratégias para detecção e implicações biológicas. *Química Nova*, 29(3), 563-568, 2006.

- ROSELAND, J. H.; TJOLSEN, A.; MOEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*, 42(2), 235-242, 1990.
- RUDIGER, A. L.; SIANI, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. The Chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). *Plant Review*, 1(1), 93-104, 2007.
- RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, J. E. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(2), 295-300, (2008).
- SALVADOR, M.; HENRIQUES, J. A. *Radicais livres e a resposta ao estresse oxidativo* Ed. ULBRA, 204p, Canoas, Brasil, 2004.
- SANCHEZ, A. M.; JIMENEZ-ORTIZ, V.; SARTOR, T.; TONN, C. E.; GARCIA, E. E.; NIETO, M.; BURGOS, M. H.; SOSA, M. A. A novel icetexane diterpene, 5-epi-icetexone from *Salvia gilliessi* is active against *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 98(2), 118-124, 2006.
- SCHIMIDT, B.; RIBNICKY, D. M.; POULEV, A.; LOGENDRA, S.; CEFALU, W. T.; RASKIN, I. A natural history of botanical therapeutics. *Metabolism Clinical and Experimental*, 57 (11), S3-S9, 2008.
- SEIFRIEDA, H. E.; ANDRSON, D. E.; FISCHER, E. I; MILNER, J. A. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 18, 567-579, 2007.
- SIANI, A. C.; GARRIDO, I. S.; MONTEIRO, S. S.; CARVALHO, E. S.; RAMOS, M. F. S. *Protium icicariba* as a source of volatile essences. *Biochemical Systematics and Ecology*, 32(5), 477-489, 2004
- SIANI, A. C.; RAMOS, M. F. S.; MENEZES-DE-LIMA JR, O.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; FERNADEZ-FERREIRA, E.; SOARES, R. O. A.; ROSAS, E. C.; SUSUNAGA, G. S.; GUIMARÃES, A. C.; ZOGHBI, M. G. B.; HENRIQUES, M. G. M. O. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. *Journal of Ethnopharmacology*, 66(1), 57-69, 1999.

- SILVA, C. G.; RAULINO, R. J.; CERQUEIRA, D. M.; MANNARINO, S. C.; PEREIRA, M. D.; PANEK, A. D.; SILVA, J. F. M.; MENEZES, F. S.; ELEUTHERIO, E. C. A. *In vitro* and *in vivo* determination of antioxidant activity and mode of action of isoquercitrin and *Hyptis fasciculata*. *Phytomedicine*, 16(8), 761-767, 2009.
- SIMÕES, C. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R.; et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento* 5a edição, Editora da UFRGS, Florianópolis, Porto Alegre, 1102p., 2004.
- SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M. G.; LUIZ, A. P.; MARCON, R.; MEOTTI, F. C.; MIOTO, L. A.; SANTOS, A. R. S. Synthetic derivatives of the α - and β -amyrin triterpenes and their antinociceptive properties. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 16(6), 3377-3386, 2008.
- SOUSA, C. M. M.; E SILVA H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; DA COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*, 30(2), 351-355, 2007.
- STUTZ, A.; GOLENBOCK, D. T.; LATZ, E. Science in medicine: Inflammasomes: too big to miss. *The Journal of Clinical Investigation*, 119(12), 3502-3511, 2009.
- SUSUNAGA, G. S.; SIANI, A. C.; PIZZOLATTI, M. G.; YUNES, R. A.; DELLE MONACHE, F. Triterpenes from the resin of *Protium heptaphyllum*. *Fitoterapia*, 72(6), 709-711, 2001.
- SUZUKI, K. Anti-oxidants for therapeutic use: Why are only a few drugs in clinical use? *Advanced Drug Delivery Reviews*, 61, 287-289, 2009
- VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M. TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84, 2007.
- VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio,

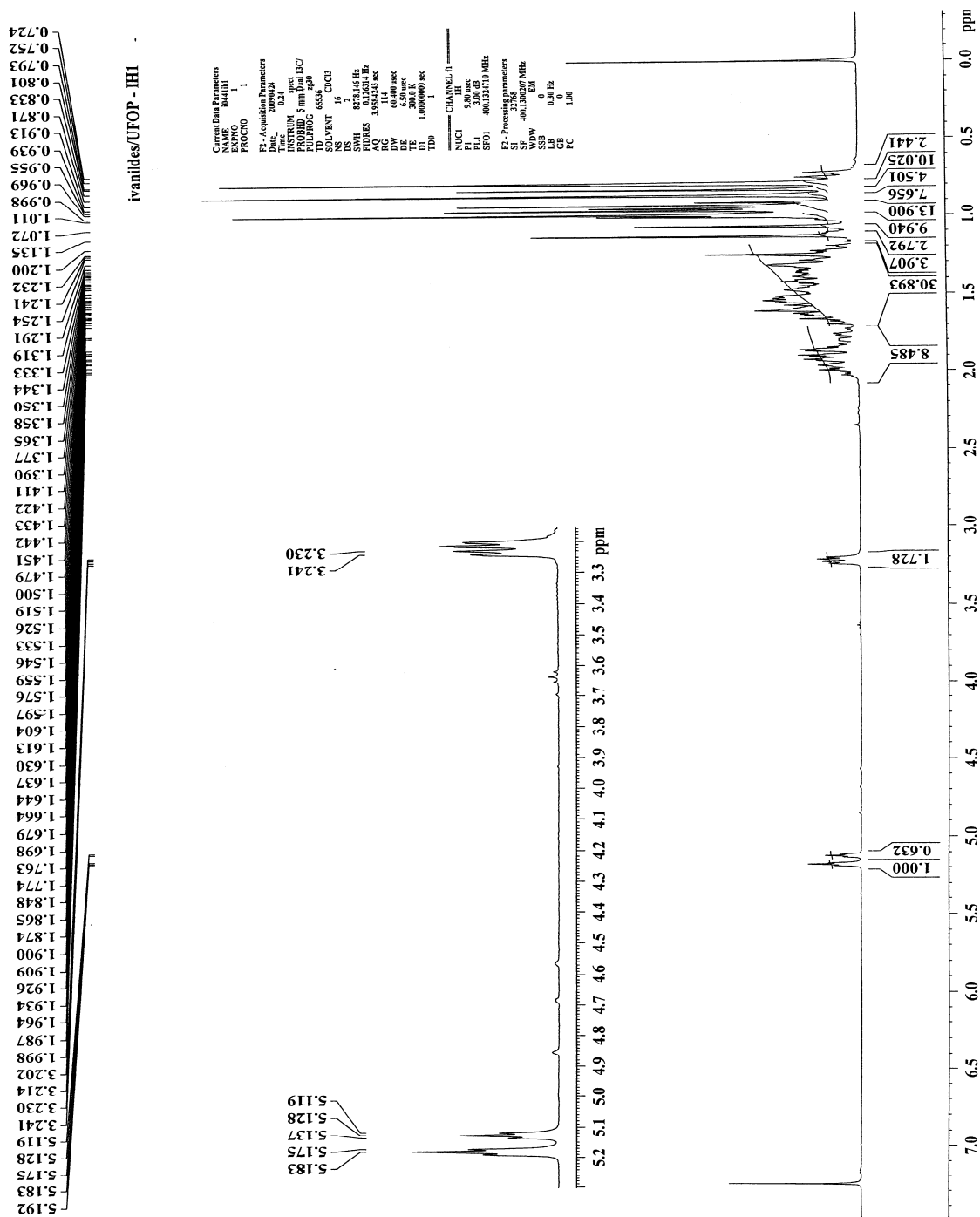
- antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Química Nova*, 30 (5), 1323-1338, 2007.
- VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? *Química Nova*, 28(3), 519-528, 2005.
- VELPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today*, 3, 232-238, 1999.
- VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 102(2), 298-301, 2005.
- VIEIRA JÚNIOR, G. M.; SOUZA, C. M. L.; CHAVES, M. H. Resina de *Protium heptaphyllum*: isolamento, caracterização estrutural e avaliação das propriedades térmicas. *Química Nova*, 28(2), 183-187, 2005
- VIEIRA, F. A. Diversidade e estrutura genética de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler em remanescentes e corredores de vegetação na região do Alto Rio Grande – MG. 2005.
- WAGNER, H.; BLADT, S. *Plant drug analysis* Springer, 2 ed., 384p., Berlim, 1996.
- WENIGER, B.; ROBLEDO, S.; ARANGO, G. J.; DEHARO, E.; ARAGÓN, R.; MUÑOZ, V.; CALLAPA, J.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 78(2-3), 193-200, 2001
- WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rats as an assay for antiinflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, 111, 544-547, 1962.
- YASUKAWA, K.; AKIHISA, T.; OINUMA, H.; KASAHARA, Y.; KIMURA, Y.; YAMANOUCHI, S.; KUMAKI, K.; TAMURA, T.; TAKIDO, M. Inhibitory effect of di- and trihydroxy terpenes from the flowers of Compositae on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 10, 1329-1331, 1996.
- YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal*

moderna, 501p., Chapecó, Argos, 2001.

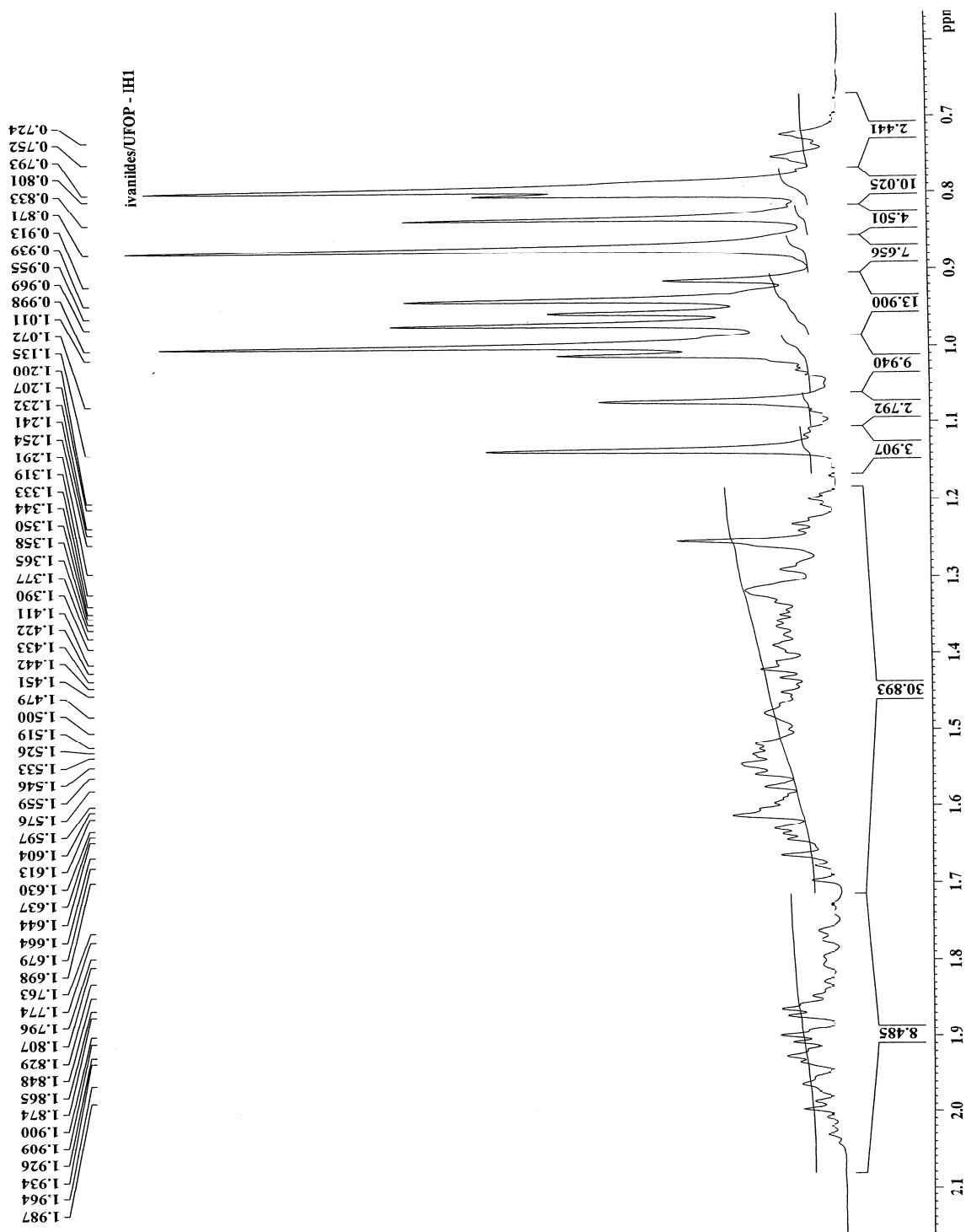
ZOGHBI, M. G. B.; SIQUEIRA, J. B. G.; WOLTER, E. L. A.; JÚNIOR, O. L. P.
Constituintes químicos de *Protium paniculatum* (Burseraceae). *Acta Amazonica*,
23(2-3), 187-189, 1993.

7- ANEXOS

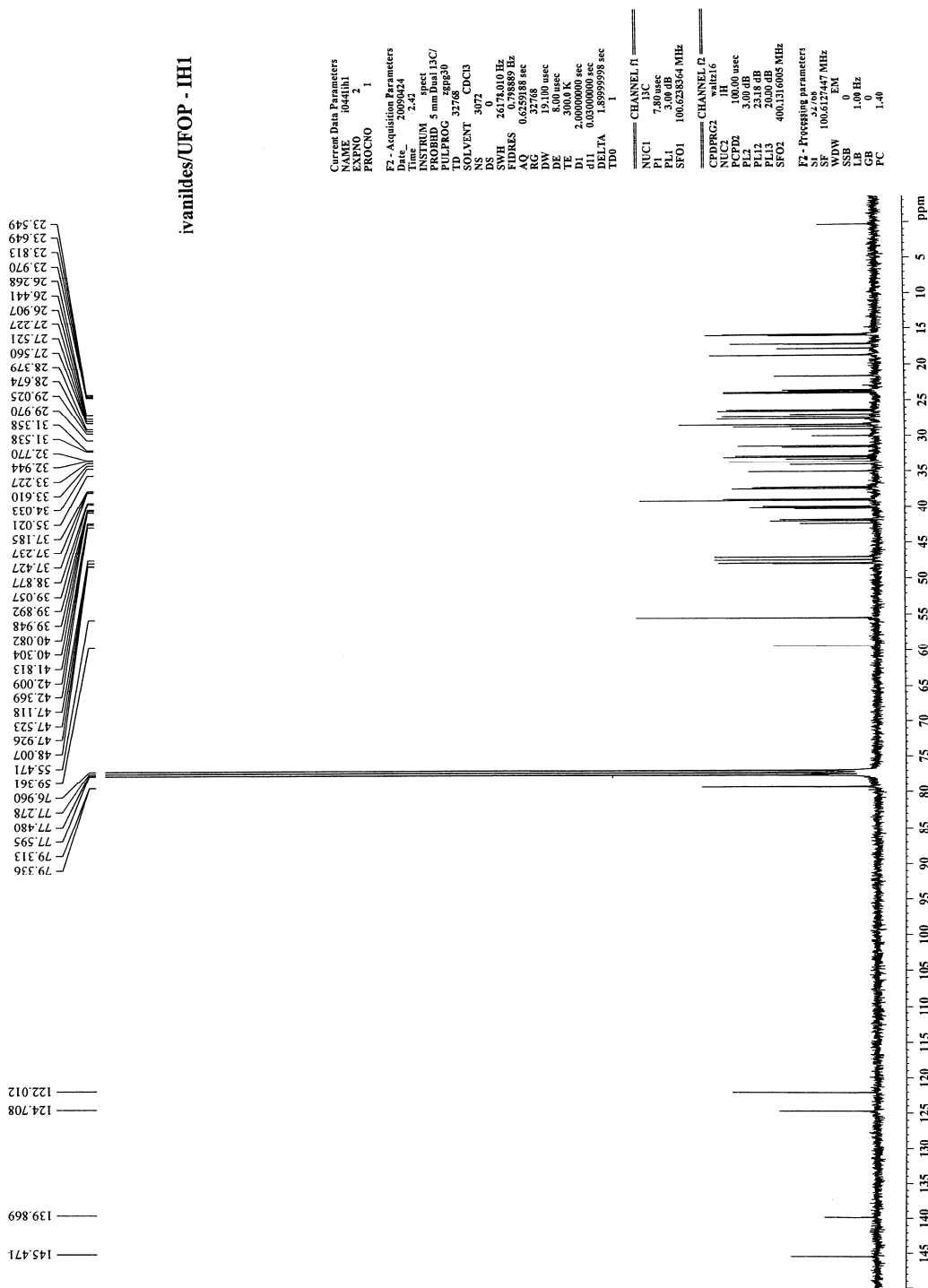
ANEXO I – RMN ¹H da substância IH1/IH2 (CDCl₃, 100MHz)



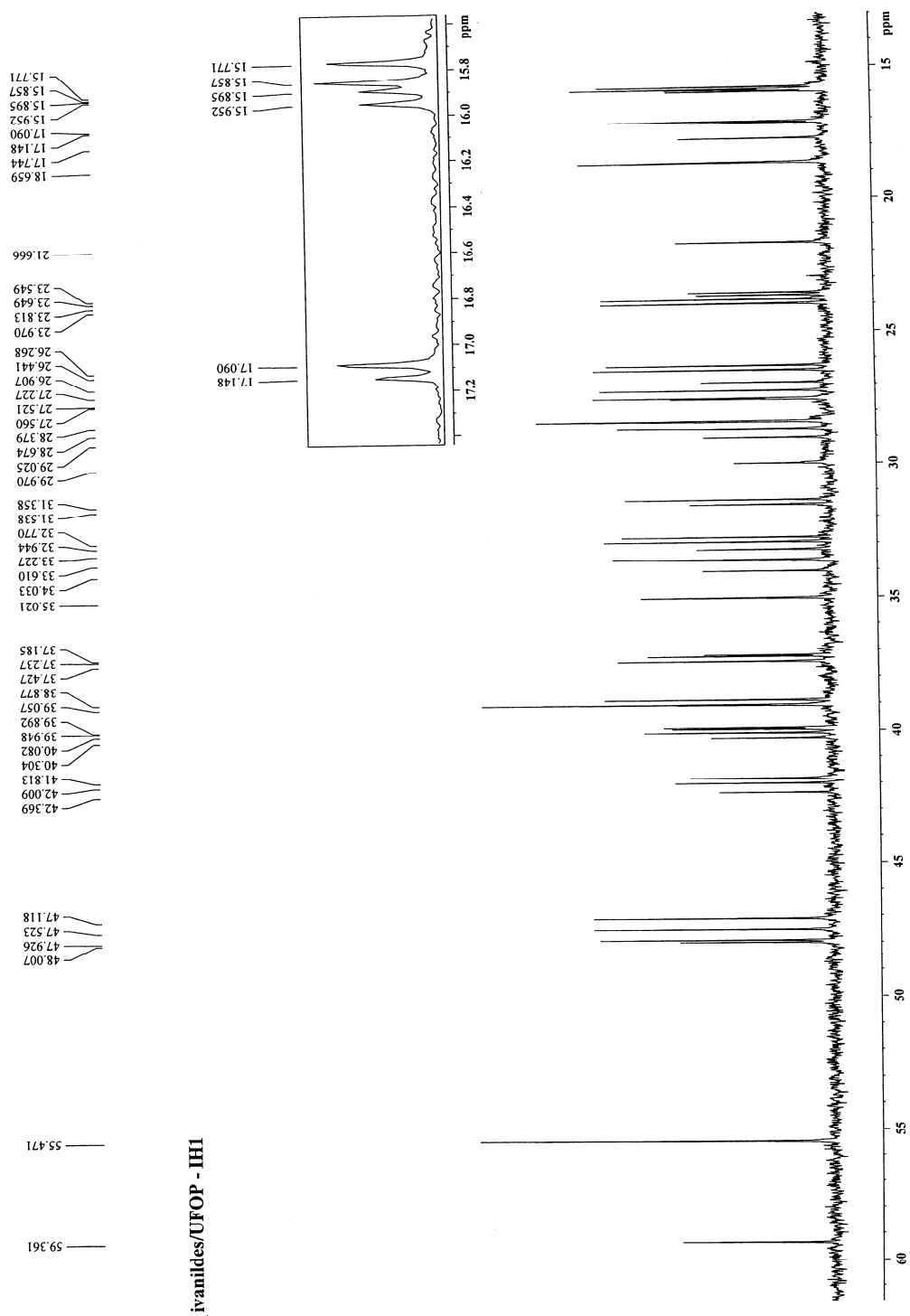
ANEXO II – Expansão da região $\delta 0-2,1$ do espectro de RMN ^1H da substância IH1/IH2
(CDCl_3 , 100MHz)



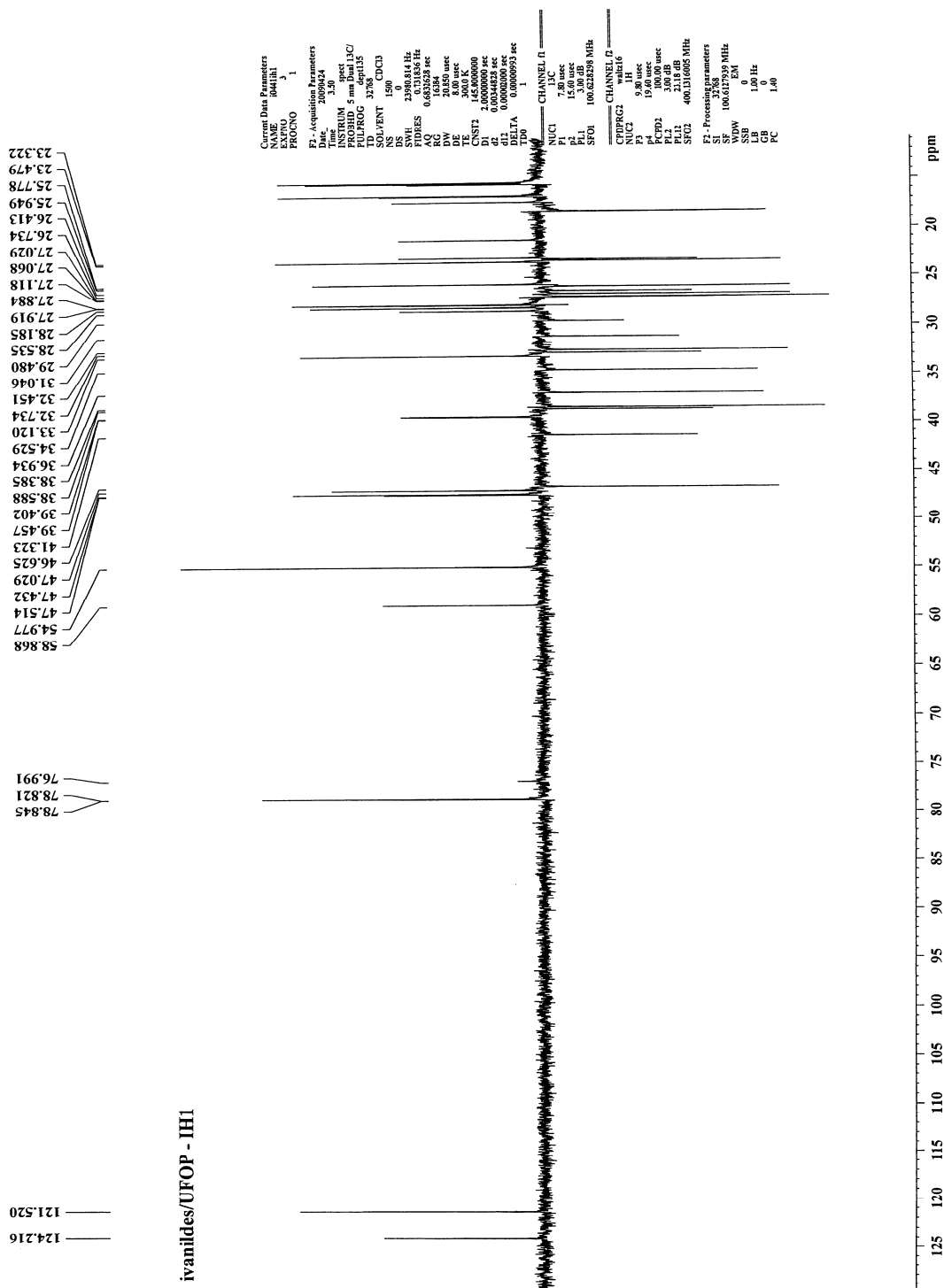
ANEXO III – Espectro de RMN ¹³C da substância IH1/IH2 (CDCl₃, 100MHz)



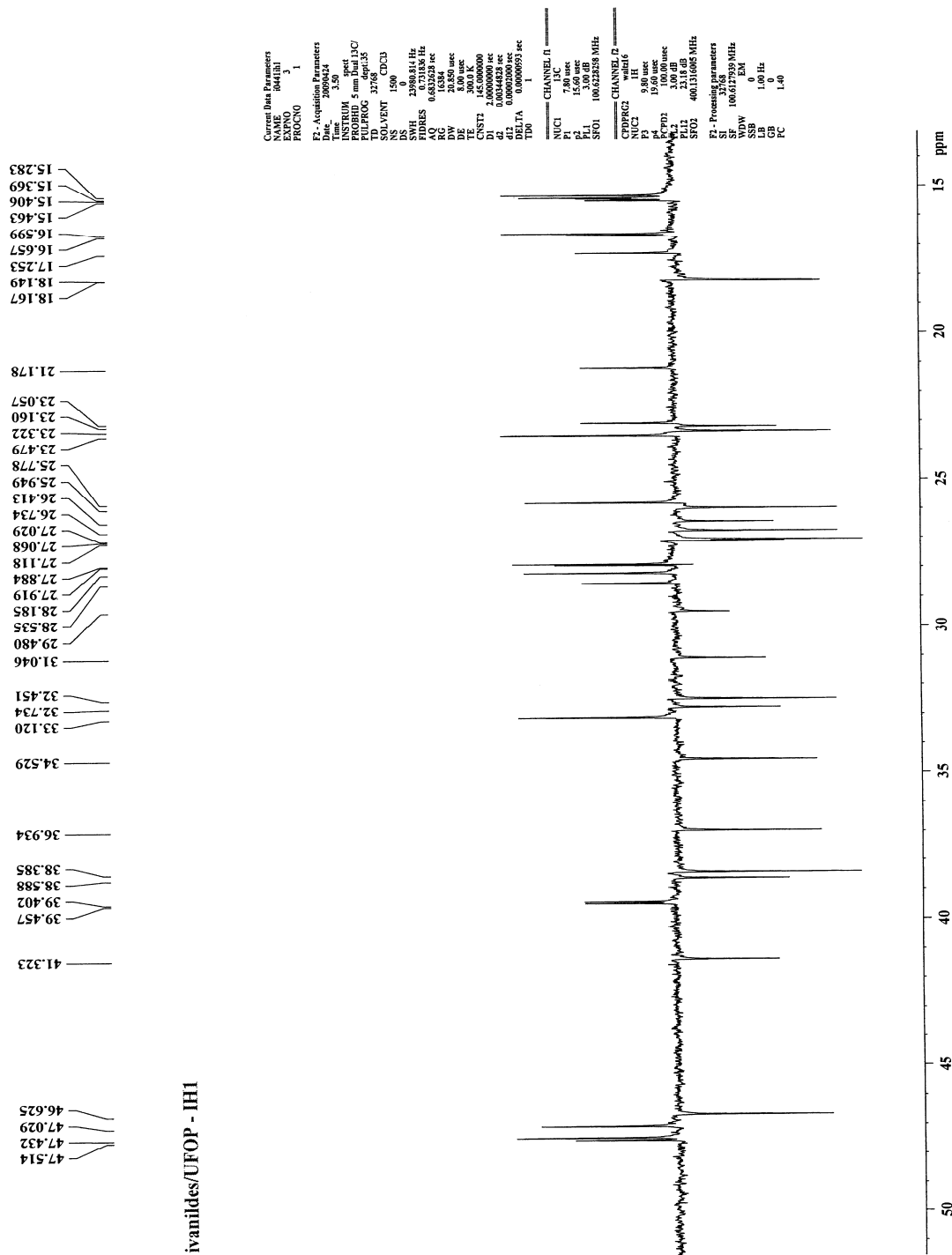
ANEXO IV – Expansão da região δ 15-60 do espectro de RMN ^{13}C da substância IH1/IH2 (CDCl₃, 100MHz)



ANEXO V – Espectro DEPT de RMN ¹³C da substância IH1/IH2 (CDCl₃, 100MHz)



ANEXO VI – Expansão da região δ 15-50 do espectro DEPT de RMN ^{13}C da substância IH1/IH2 (CDCl_3 , 100MHz)



ivanildes/UFOP - IH1

ANEXO VII – Espectro de RMN ¹H bidimensional COSY da substância IH1/IH2 (CDCl₃, 100MHz)

ivanildes/UFOP - IH1

```

Current Data Parameters
NAME      j0441h1
EXPNO     4
PROCNO    1

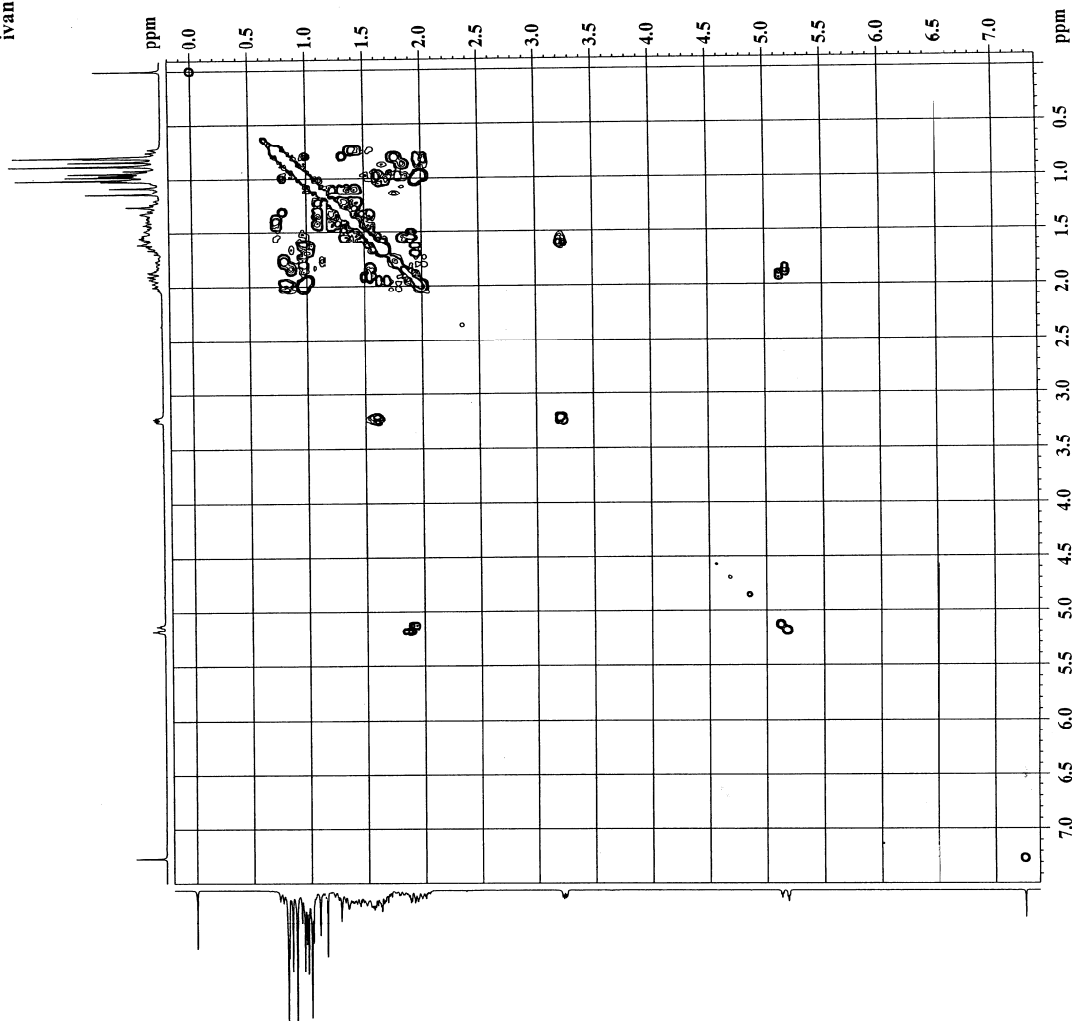
F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090424
Time      3.51
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   cosyg
TD         2048
SOLVENT   1 CDCl3
NS         1
DS         1
AQ         8012.500 Hz
FIDRES    3.911510 Hz
AQ         0.1278452 sec
RG         181
DE         62.400 usec
TE         300.0 K
D0         0.00000300 sec
D1         0.00000000 sec
D13       0.00000000 sec
D16       0.00000000 sec
D20       0.00000000 sec
RG         0.00012480 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1      1H
P0         9.80 usec
PL1        9.80 usec
PL2        3.00 dB
SFO1      400.132609 MHz

F1 - Acquisition parameters
NUC1      1
TD         1024
SFO1      400.1328 MHz
FIDRES    7.825020 Hz
SW         20.025 ppm
F2MODE    QF

F2 - Processing parameters
SI         2048
SF         400.130185 MHz
WDW        0
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
PC         1.00

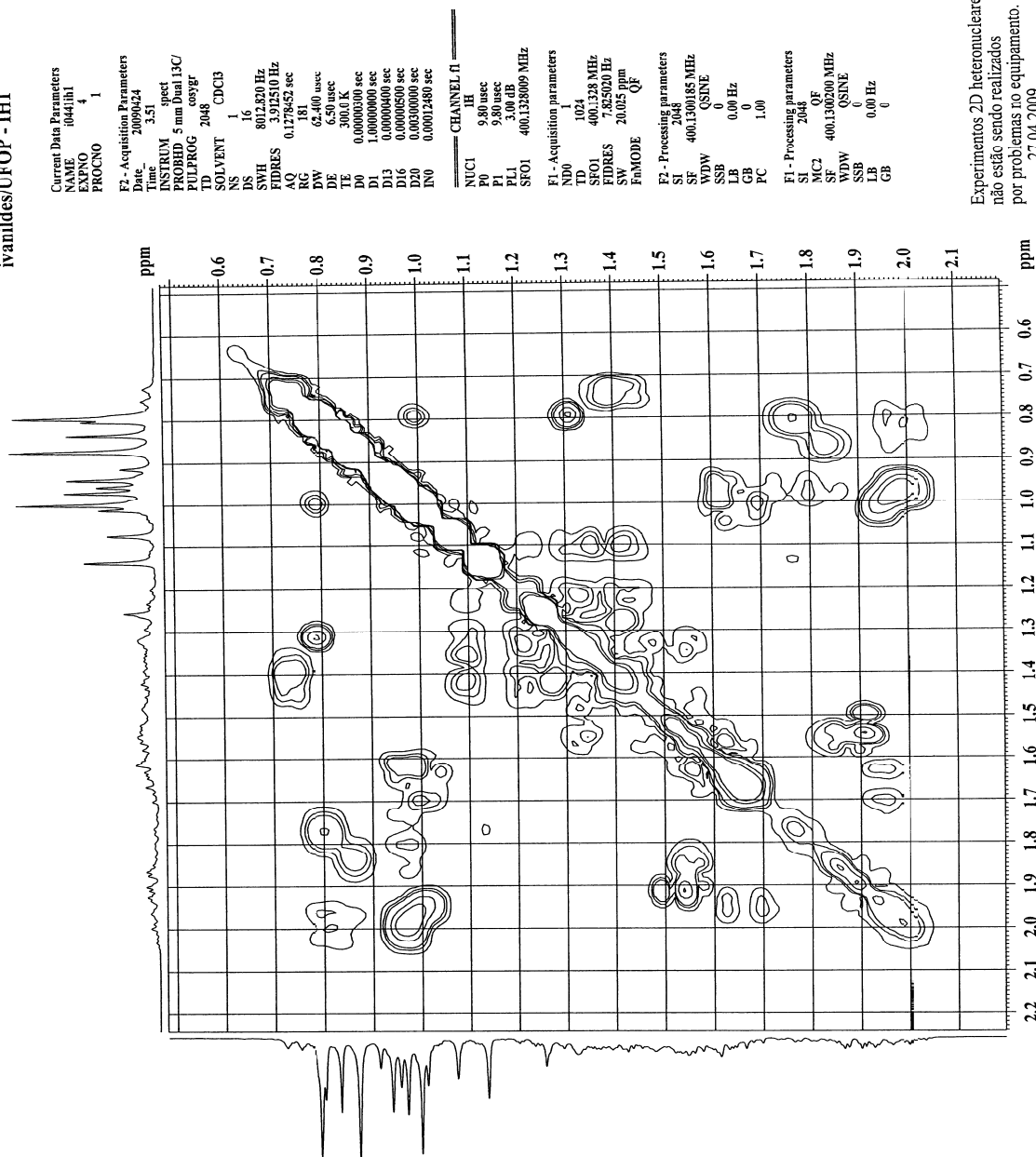
F1 - Processing parameters
SI         2048
MC2        0
SF         400.130185 MHz
WDW        0
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
    
```



Experimentos 2D heteronucleares não estão sendo realizados por problemas no equipamento. 27/04/2009

ANEXO VIII – Expansão da região δ 0-2,2 do espectro de RMN ^1H bidimensional COSY da substância IH1/IH2 (CDCl_3 , 100MHz)

ivanildes/UOP - IH1



```

Current Data Parameters
NAME      ihd41ih1
EXPNO     4
PROCNO    1

F2 - Acquisition Parameters
Date_     20090724
Time      3.51
INSTRUM   spect
PROBHD    5 mm Dual 13C/
PULPROG   cosyg
TD         2048
SOLVENT   CDCl3
NS         16
DS         1
SWH        8012.870 Hz
AQ         3.912510 Hz
FIDRES     0.1278452 sec
RG         181
DE         62.400 usec
TE         300.0 K
D0         0.0000000 sec
D1         1.0000000 sec
D13        0.0000000 sec
D16        0.0000000 sec
D20        0.0000000 sec
IN0        0.00012480 sec

===== CHANNEL f1 =====
NUC1       1
P1         9.80 usec
PL1        0.00 dB
PL2        3.00 dB
SFO1       400.1328009 MHz

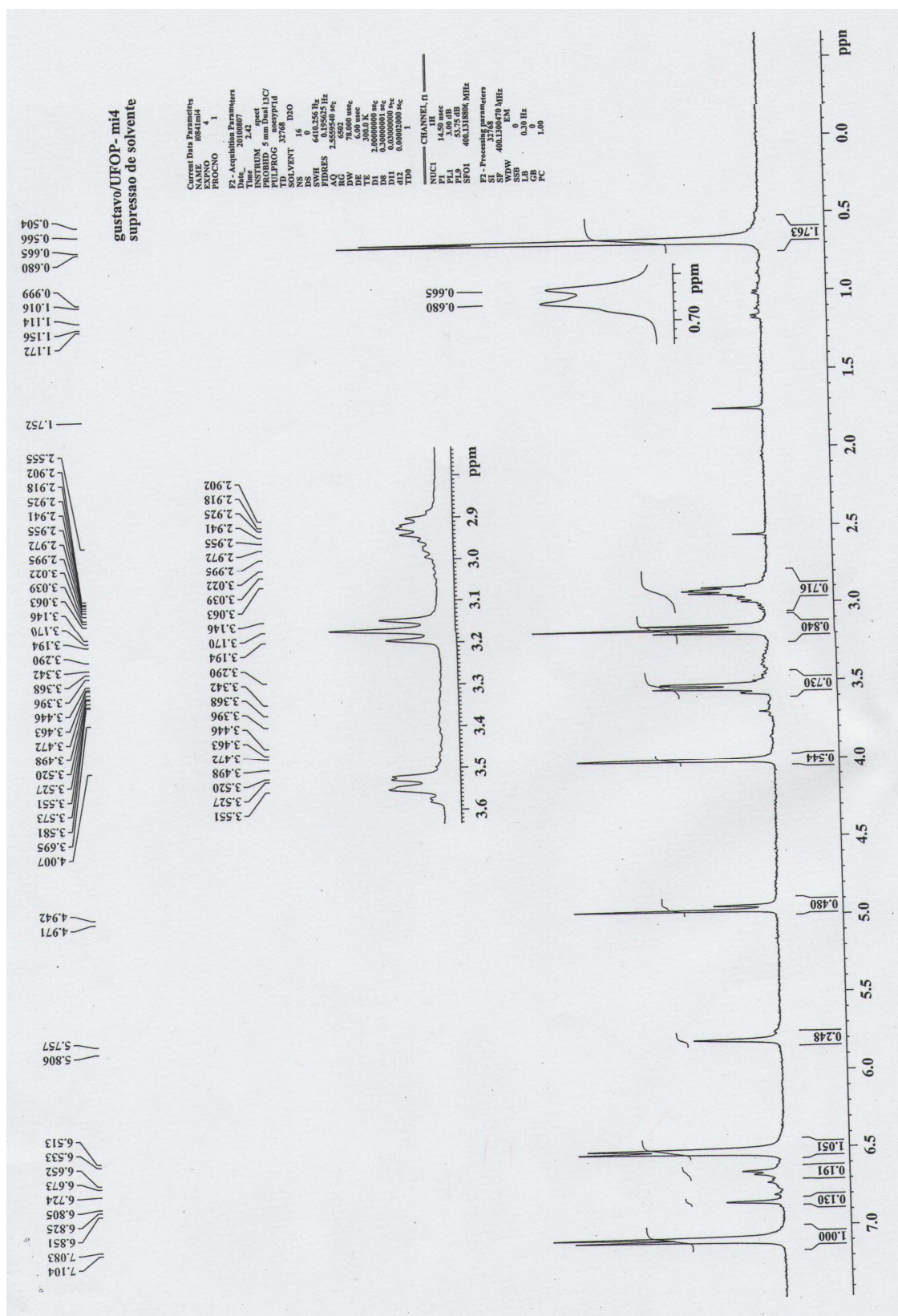
F1 - Acquisition parameters
ND0         1
TD          1024
SFO1       400.1328 MHz
FIDRES     7.825020 Hz
SW         20.025 ppm
F2MODE     QF

F2 - Processing parameters
SI         400.1300165 MHz
WDW        0
SSB        0
GB         0.00 Hz
PC         1.00

F1 - Processing parameters
SI         2048
MC2        QF
SF         400.1300200 MHz
WDW        0
SSB        0
LB         0.00 Hz
GB         0
    
```

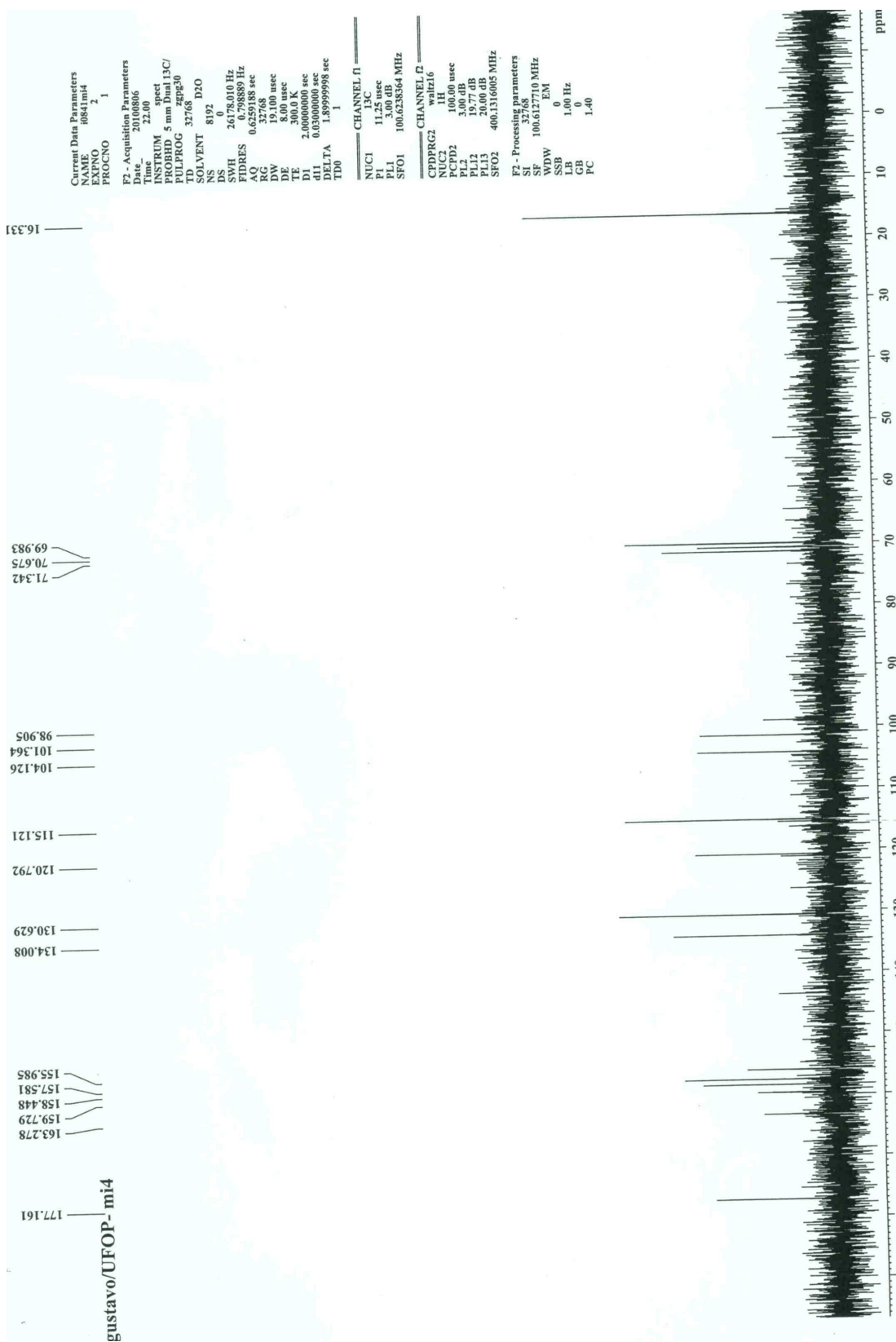
Experimentos 2D heteronucleares não estão sendo realizados por problemas no equipamento. 27/04/2009

ANEXO IX – Espectro de RMN¹H (D₂O, 400 Mhz) para a substância MI4.

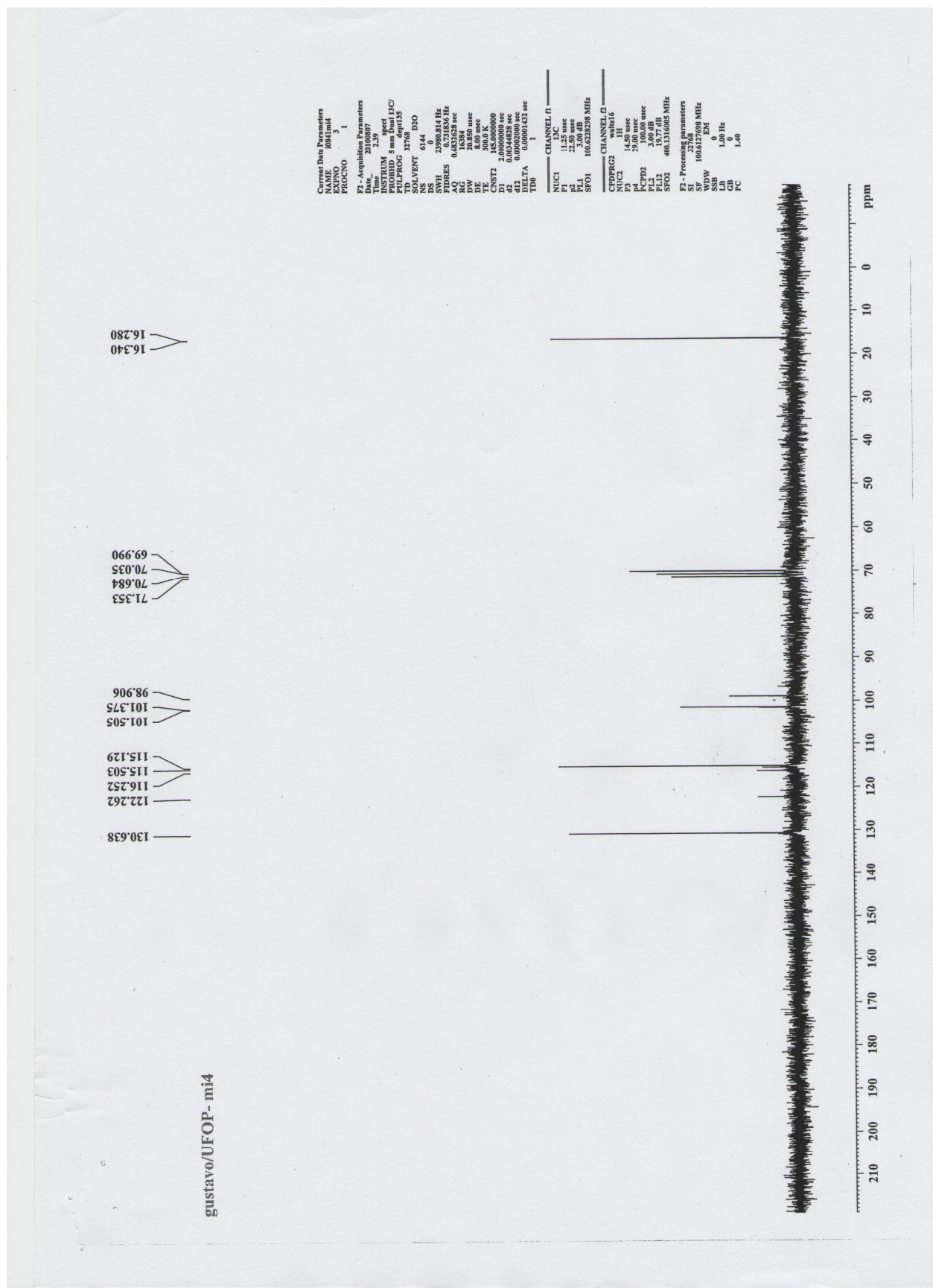


AN

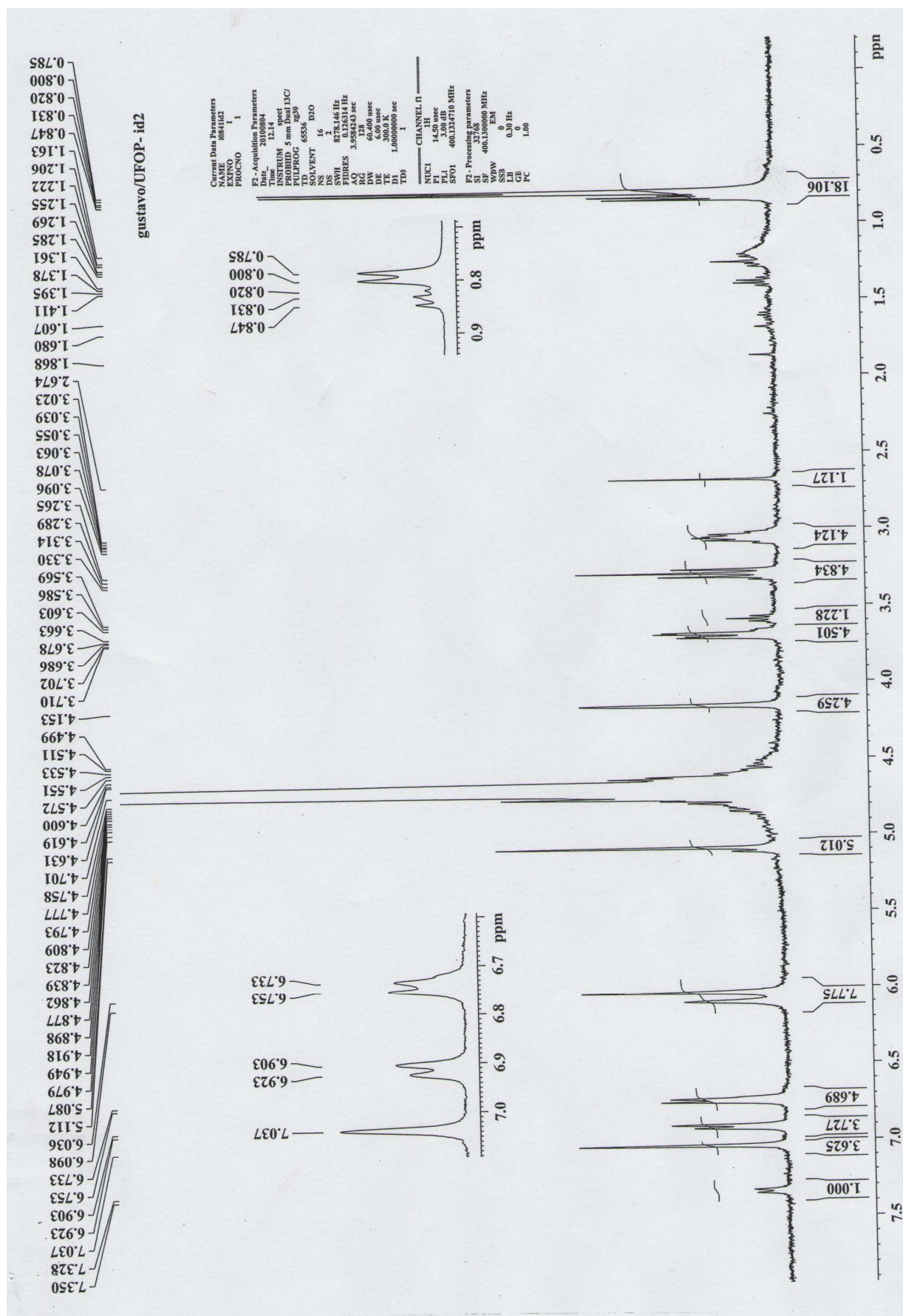
ANEXO X – Espectro de RMN¹³C (D₂O, 100 Mhz) para a substância MI4.



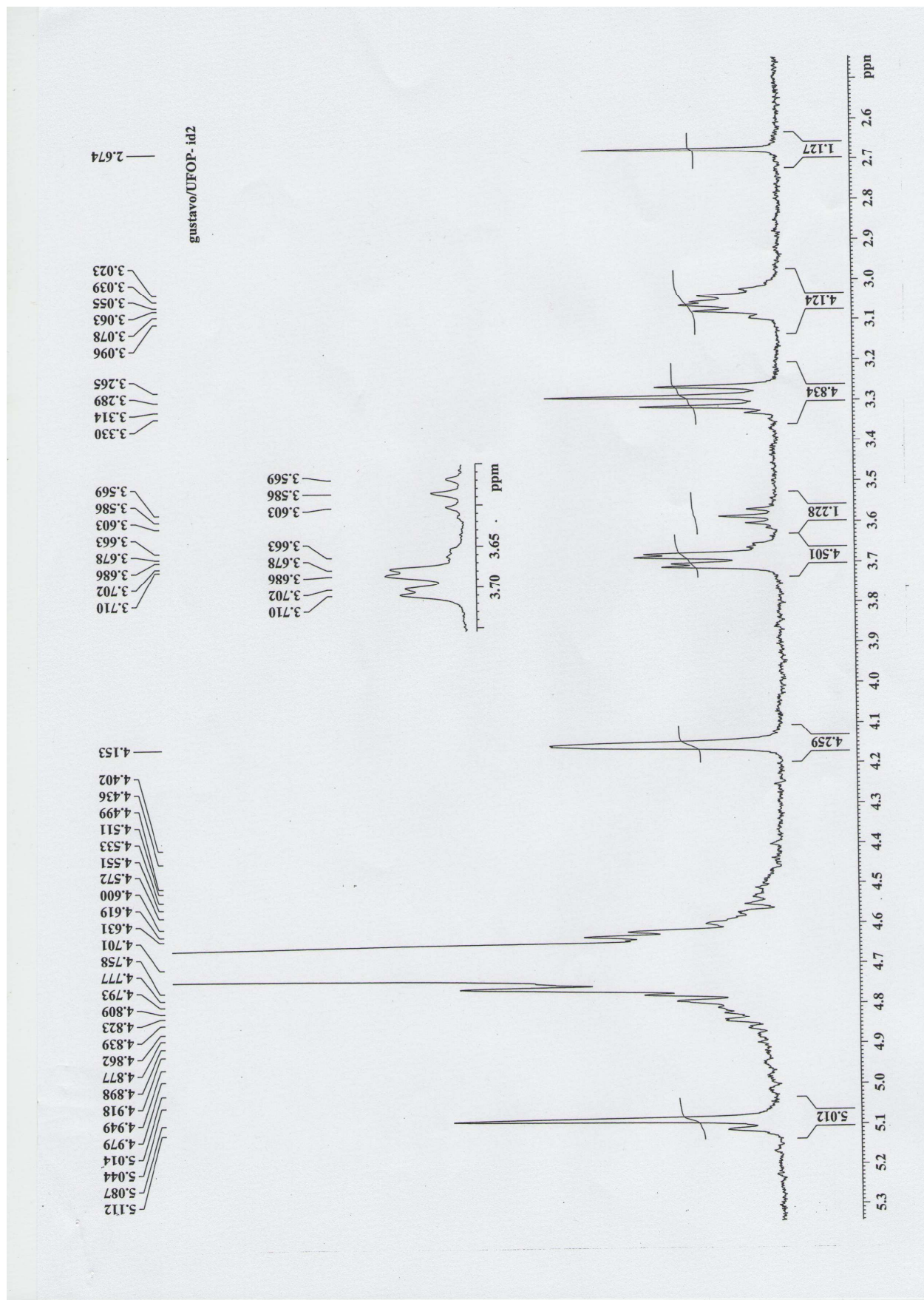
ANEXO XI – Espectro de DEPT de RMN¹³C da substância MI4 (D₂O, 100 MHz)



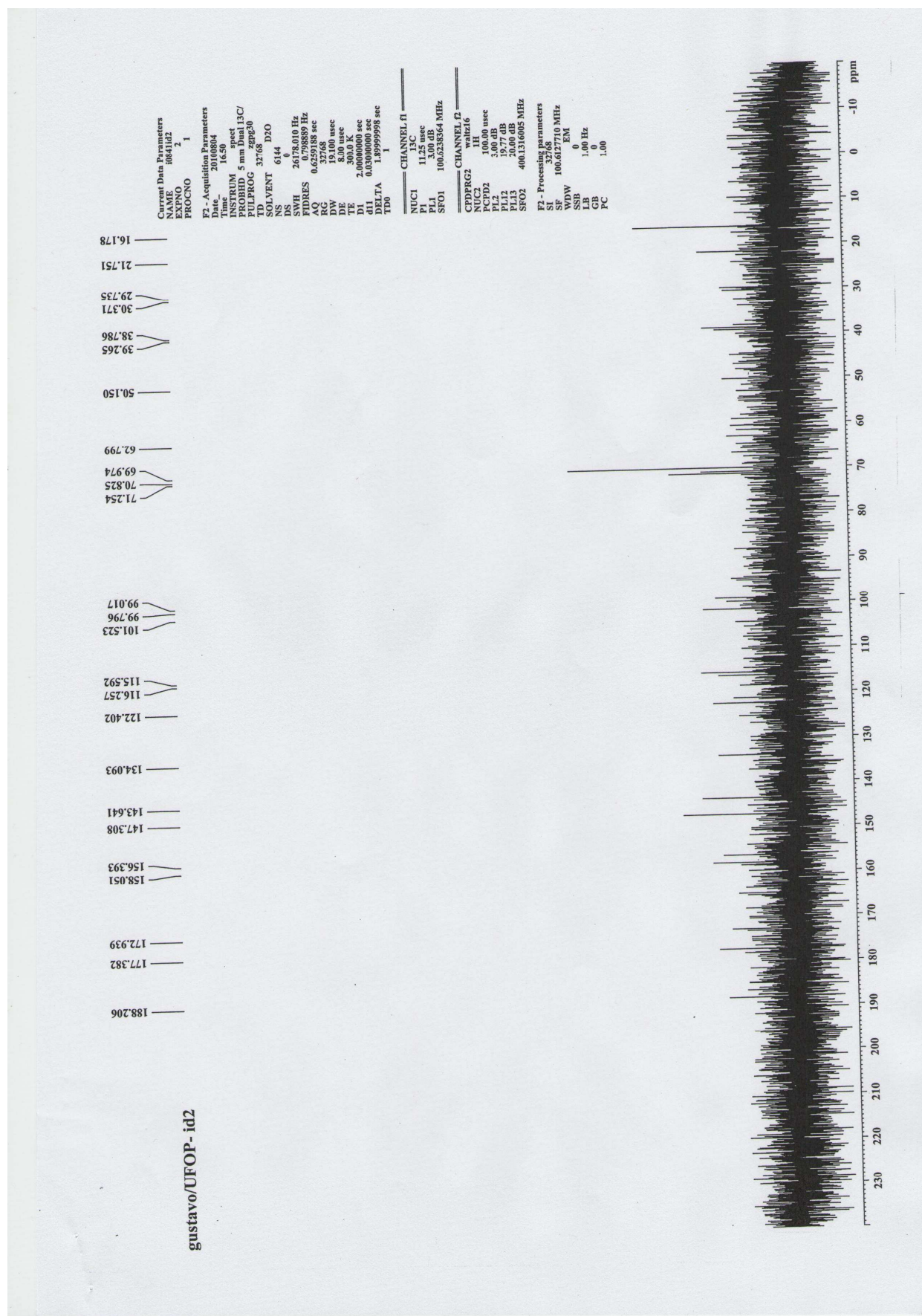
ANEXO XII – Espectro de RMN¹H (D₂O, 400 Mhz) para a substância ID2.



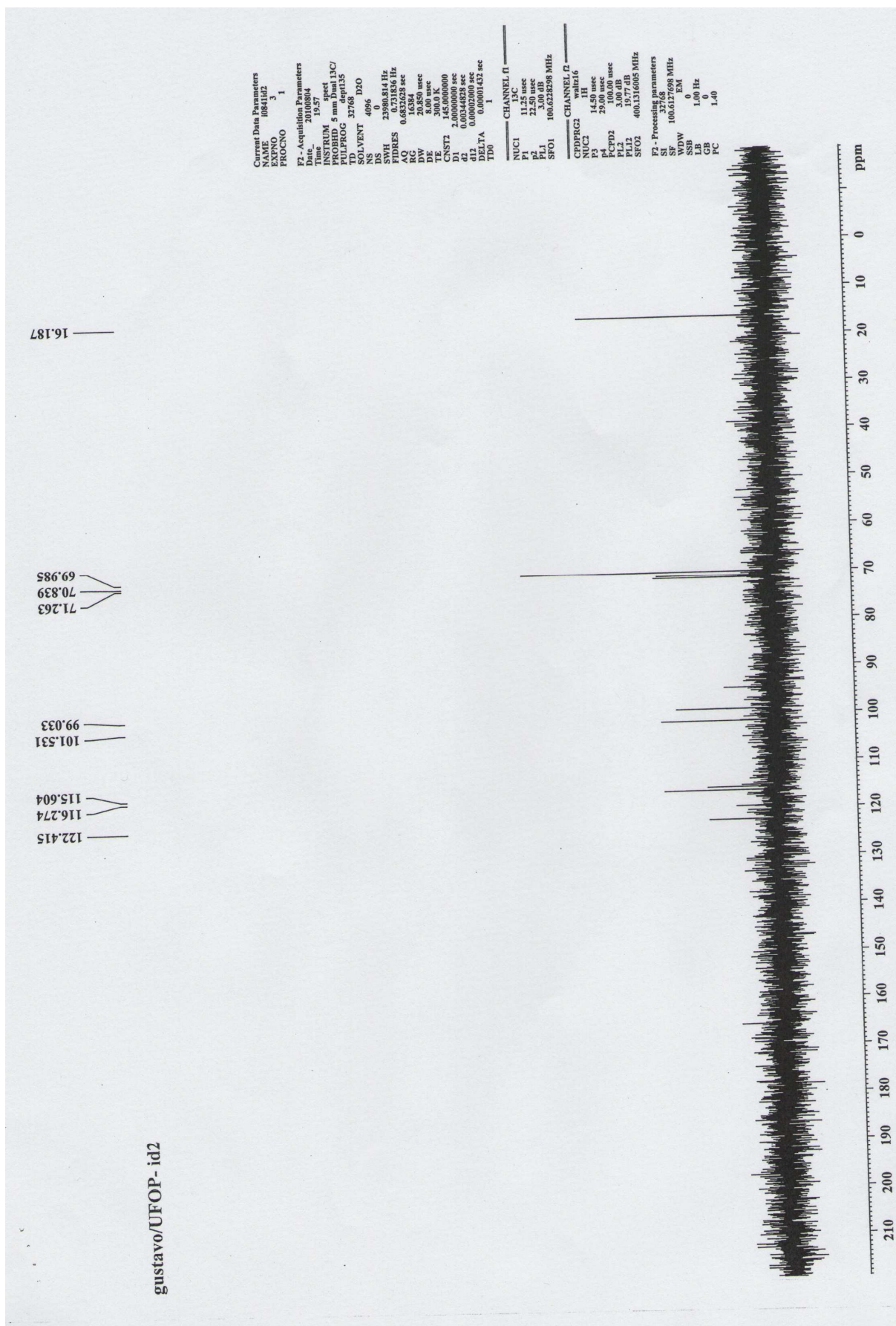
ANEXO XIII – Expansão da região δ 2,5-5,3 do espectro de RMN¹H da substância ID2



ANEXO XIV – Espectro de RMN¹³C da substância ID2 (D₂O, 100 MHz)



ANEXO XV – Espectro de DEPT de RMN¹³C da substância ID2 (D₂O, 100 MHz)



ANEXO XVI – Produção Científica Associada à Dissertação

Artigo submetido

RODRIGUES, I. V.; CHIBLI, L. A.; SOUZA, J. N. P.; GRABE-GUIMARÃES, A., DE SOUZA, G. H. B.; CABRAL, V. A. R.; PERAZZO, F. F. **Avaliação da atividade antiinflamatória e antinociceptiva das folhas de *Protium spruceanum* Benth. (Engler), Burseraceae**

Resumos publicados em anais de congressos

PINTO, I. V. ; COELHO, F. F. ; CHIBLI, L. A. ; CABRAL, V. A. R.; VIEIRA FILHO, S. A.; DOS SANTOS, O. H. D.; SOUZA, G. H. B. **Antioxidant activity of crude extracts obtained by different methods of extraction from leaves of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.** In: 7th International Congress of Pharmaceutical Sciences, Ribeirão Preto – SP, CIFARP 2009, 2009.

COELHO, F. F. ; HRONCOVA, E.; PINTO, I. V. ; GRABE-GUIMARÃES, A.; SOUZA, G. H. B. **Evaluation of the anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.** In: 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVIII RESEM, São Pedro – SP. 2nd Brazilian Conference on Natural Products and XXVIII RESEM, 2009.

PINTO, I. V. ; COELHO, F. F. ; PERAZZO, F. F. ; VIEIRA FILHO, S. A. ; GUIMARÃES, A. G. ; SOUZA, G. H. B. **Avaliação da Atividade Antinociceptiva do Extrato Etanólico Bruto e das Frações Hexânica e Metanólica de Folhas de *Protium spruceanum* (Benth.) Engler.** In: II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade Latino-americana de Fitoquímica, 2008, Belo Horizonte – MG. II Congresso de Fitoterápicos do Mercosul e VI Reunião da Sociedade Latino-americana de Fitoquímica, 2008.

PINTO, I. V. ; COELHO, F. F. ; GUIMARÃES, A. G. ; SOUZA, G. H. B. **Evaluation of the Peripheral Analgesic Activity of The Crude Ethanol Extract of Protium spruceanun (Benth.) Engler.** In: 3rd International Symposium of Post Graduation and Research, 2008, Ribeirão Preto – SP 3rd International Symposium of Post Graduation and Research, 2008.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)