

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA PROGRAMA INSTITUCIONAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

TRIAGEM FARMACOLÓGICA DE *BYRSONIMA DUCKEANA* W. R. ANDERSON (MALPIGHACEAE) EM MODELOS ANIMAIS DE DOR INFLAMATÓRIA PROGRAMA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFAM

Bolsista: Kleyton Cardoso de Andrade, FAPEAM

MANAUS

2013

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-
GRADUAÇÃO DEPARTAMENTO DE APOIO A PESQUISA PROGRAMA INSTITUCIONAL
DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

PIB-S/0079/2011

TRIAGEM FARMACOLÓGICA DE *BYRSONIMA DUCKEANA* W. R. ANDERSON
(MALPIGHACEAE) EM MODELOS ANIMAIS DE DOR INFLAMATÓRIA PROGRAMA DE
INICIAÇÃO CIENTÍFICA NA UFAM

Bolsista: Kleyton Cardoso de Andrade, FAPEAM

Orientadora: Profa. Fernanda Guilhon Simplicio

MANAUS

2013

Todos os direitos deste relatório são reservados à Universidade Federal do Amazonas, ao Núcleo de Estudo e Pesquisa em Ciência da Saúde e aos seus autores. Parte deste relatório só poderá ser reproduzida para fins acadêmicos ou científicos

Esta pesquisa, financiada pela Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM, através do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Universidade Federal do Amazonas, e se caracteriza como sub projeto do projeto de pesquisa “Potencial medicinal de espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) de ocorrência na cidade de Manaus, Amazonas, Brasil.”

RESUMO

Várias espécies do gênero *Byrsonima* (Malpighiaceae) tem diversas aplicações terapêuticas na medicina popular em todo o território brasileiro, das quais várias atividades farmacológicas já foram cientificamente comprovadas. No entanto, as espécies de ocorrência na região Norte do Brasil tem sido pouco estudadas. Dado o exposto, selecionamos a espécie arbórea *B. duckeana*, nativa da região Amazônica, para ser objeto deste estudo, cujo objetivo foi investigar o potencial analgésico das suas folhas, comparando o extrato etanólico bruto com suas frações hexano, diclorometano e acetato de etila, visando direcionar o fracionamento fitoquímico do mesmo, verificando ainda a segurança da administração das amostras pela via oral em animais de experimentação. Verificou-se que as amostras são relativamente seguras para administração oral, pois não causaram mortes ou sinais de toxicidade em camundongos expostos a uma dose de 2000 mg/kg. Com exceção da fração hexano, todas as outras amostras testadas apresentaram atividade analgésica significativa ($p < 0,05$) e equivalentes entre si, no teste das contorções abdominais, a uma dose de 100 mg/kg. Por questão de conveniência e segurança, selecionou-se a fração acetato de etila para ter seu potencial analgésico melhor investigado no teste da placa quente, onde foram testadas as doses de 5, 50 e 200 mg/kg, que apresentaram atividade analgésica significativa equivalente a da indometacina a 10 mg/kg. O presente trabalho mostrou que o extrato etanólico bruto e suas frações diclorometano e acetato de etila, possuem atividade analgésica significativa e equivalente, devendo esse ser o direcionamento do fracionamento fitoquímico do extrato em busca de substâncias biologicamente ativas. A segurança de uso dessas amostras por via oral possibilita que esse fracionamento seja biomonitorado.

Unitermos: Malpighiaceae, Amazônia, analgesia, compostos polares.

ABSTRACT

Several species of the genus *Byrsonima* (Malpighiaceae) has different therapeutic applications in folk medicine throughout the Brazilian territory, of which several pharmacological activities have been scientifically proven. However, the species occurring in northern Brazil has been poorly studied. Thus, we selected the tree species *B. duckeana*, native to the Amazon region, to be the object of this study, whose aim was to investigate the analgesic potential of their leaves, comparing the crude ethanol extract and its fractions hexane, dichloromethane and ethyl acetate, in order to drive the phytochemical fractionation, checking yet security administration of this samples by oral route in experimental animals. It was found that the samples are relatively safe for oral administration, since caused no deaths or toxicity signs in mice exposed to dose of 2000 mg / kg. With the exception of hexane fraction, all other tested samples showed significant and equivalent analgesic activity ($p < 0.05$) in the abdominal writhing test, at 100 mg / kg. For convenience and safety, we selected the ethyl acetate fraction to better investigation of their analgesic potential in the hot plate test, in which were tested the doses of 5, 50 and 200 mg / kg, which showed significant analgesic activity equivalent to indomethacin 10 mg / kg. The present study showed that the ethanol extract and its dichloromethane and ethyl acetate fractions, have significant and equivalent analgesic activity, and this should be the direction of the phytochemical fractionation of the extract in search of biologically active substances. The safety of oral use of these samples indicates that this fractionation can be biomonitoring.

Key words: Malpighiaceae, Amazonia, analgesia, polar compounds.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	OBJETIVO.....	10
2.1	Objetivo geral.....	10
2.2	Objetivos específicos	10
3	REVISÃO TEÓRICA	11
3.1	Malpighiaceae e Byrsonima.....	11
3.2	Dor	12
3.3	Analgésicos	14
4	METODOLOGIA	16
4.1	Coleta e identificação do material botânico.....	16
4.2	Preparação da matéria prima vegetal e obtenção dos extratos e frações.....	16
4.3	Teste de solubilidade.....	Erro! Indicador não definido.
4.4	Animais utilizados no estudo	17
4.5	Avaliação de toxicidade aguda	17
4.6	Teste das contorções abdominais.....	18
4.7	Teste da placa quente	19
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÕES.....	24
7	CRONOGRAMA.....	25
	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	26

1 INTRODUÇÃO

O potencial das plantas como fonte natural de fármacos é bastante conhecido e vem sendo cada vez mais valorizado. As plantas medicinais, reconhecidas e utilizadas pela população como medicamentos, têm se mostrado promissoras como fontes de substâncias biologicamente ativas e/ou protótipos dessas. Comparativamente, são encontradas mais atividades farmacológicas em plantas utilizadas na medicina popular que naquelas escolhidas ao acaso para estudo (MACIEL, 2002; CORRÊA et al., 2003).

O Brasil possui a maior biodiversidade do planeta. Além disso, é estimado que populações indígenas do país utilizem em torno de 1300 espécies como medicamentos (YUNES et al., 2001). Dentre as inúmeras espécies de plantas utilizadas na medicina popular do Brasil, merecem destaque as espécies do gênero *Byrsonima*, um dos maiores da família Malpighiaceae, com cerca de 150 membros, 50% dos quais de ocorrência no Brasil (CARDOSO, 2006; TEIXEIRA; MACHADO, 2000; GIESE, 2000). Diversas partes das espécies, destacando-se as folhas, são largamente empregadas na medicina popular das regiões norte, nordeste e centro-oeste do país, sendo utilizadas no tratamento de feridas, doenças de pele, bronquites, diarreias, gastrites e úlceras, entre outros usos (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA et al., 2011).

A observação do uso na medicina popular de espécies do gênero *Byrsonima* têm motivado diversos estudos científicos, levando ao isolamento de várias substâncias de interesse farmacológico, além da comprovação de atividades de diversas terapêuticas, como atividade antifúngica, antibacteriana, antitripanossoma, antiespasmódica e anti-inflamatória. Apesar de promissores, esses resultados são restritos a apenas 13 espécies do gênero que já foram estudadas cientificamente (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA et al., 2011).

Na Amazônia são encontradas metade das espécies vegetais do globo e um terço das espécies de árvores do planeta (ABRANTES, 2003), sendo assim, uma valiosa fonte de plantas com potencial terapêutico, uma vez que a probabilidade de obtenção de produtos terapêuticamente

ativos aumenta com a diversidade de espécies (GUERRA; NODARI, 2007). O Estado do Amazonas concentra grande parte de toda essa riqueza natural, onde são encontradas, inclusive, várias espécies do gênero *Byrsonima*. Entretanto, o número de estudos científicos de plantas de ocorrência local não faz jus ao grande potencial regional como fonte de novos produtos terapêuticos. Dessa forma, o estudo científico de plantas do Amazonas é uma iniciativa que merece ser valorizada e incentivada.

A inflamação é uma resposta genérica do organismo a agressões químicas, físicas ou biológicas, que se deve a ação de diversas substâncias liberadas pelas células a fim de reparar o dano e/ou eliminar o agente lesivo (MORGAN, 2007). A ação dessas substâncias provoca, invariavelmente, dor, edema, vermelhidão e aquecimento no local da lesão, fenômenos que, dado esse fato, são conhecidos como os sinais cardinais da inflamação, podendo vir ou não acompanhados de perda da função da área afetada (JANEWAY JR. et al., 2007).

Entre os sinais cardinais da inflamação, a dor é o que mais onera os sistemas de saúde, devido ao grande desconforto que causa aos pacientes. Isso implica de forma direta no fato de que os anti-inflamatórios não esteroidais são os medicamentos mais produzidos e mais utilizados em todo o mundo (STEINMEYER, 2000). No entanto, já é bem conhecida a ação lesiva desses medicamentos sobre a mucosa gástrica, o que contribui para o desenvolvimento de gastrites e úlceras, principalmente em pacientes que fazem uso prolongado desses medicamentos (WALLACE; VONG, 2008). Por isso, a busca por novos agentes terapêuticos mais eficazes no combate a dor inflamatória é tão relevante.

Apesar de pertencer a um gênero farmacologicamente promissor, fato comprovado em vários estudos científicos, *Byrsonima duckeana*, espécie arbórea facilmente encontrada na zona rural da cidade de Manaus, é uma das milhares de espécies da região Amazônica que ainda não foram investigadas quanto ao seu potencial farmacológico ou como fonte de substâncias ou protótipos de novas substâncias com possível aplicação na medicina.

Em atenção a isso, recentemente foi idealizado um estudo multidisciplinar com a espécie, que visa investigar o potencial farmacológico de um extrato etanólico produzido com suas folhas e realizar estudo fitoquímico do mesmo em busca de substâncias de interesse terapêutico. Dentro desse contexto, este trabalho avaliou o potencial analgésico do extrato etanólico de *B. duckeana* e de três frações menos polares do mesmo, em modelos animais de do inflamatória, visando contribuir para o direcionamento do estudo fitoquímico que está sendo realizado com a espécie.

2 OBJETIVO

2.1 Objetivo geral

Investigar o potencial analgésico do extrato etanólico bruto e frações hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a segurança da administração do extrato etanólico bruto e frações hexano, diclorometano e acetato de etila de das folhas *Byrsonima duckeana*;
- Comparar a atividade analgésica de um extrato etanólico das folhas de *B. duckeana* com a de suas frações hexano, diclorometano e acetato de etila;
- Contribuir para o direcionamento do estudo fitoquímico biomonitorado do extrato etanólico das folhas de *B. duckeana*.

3 REVISÃO TEÓRICA

3.1 Malpighiaceae e Byrsonima

Malpighiaceae é uma família botânica com 71 gêneros e 1250 espécies. Estas espécies são principalmente trepadeiras, embora árvores e arbustos também sejam comuns. Algumas espécies de Malpighiaceae são economicamente interessantes, por exemplo, a acerola (*Malpighia emarginata*), uma fonte rica de vitamina C. Os gêneros *Banisteriopsis* e *Diplopterys* incluem espécies com ações alucinógenas, dentre as quais, *Banisteriopsis caapi*, achado no Norte da América do Sul. Espécies dos gêneros *Banisteriopsis*, *Galphimia*, *Malpighia*, *Peixotoa* e *Stigmaphyllon* também são cultivados como plantas ornamentais (LOMBELLO et al., 2003). Uma revisão acerca da constituição química dessa família registra como principais fitoconstituintes os alcaloides carbolínicos, bases indólicas simples, fenilpropanoides, flavonoides, triterpenoides e polissacarídeos em diferentes gêneros (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA et al., 2011)

O gênero mais extensivamente estudado tem sido o *Byrsonima*, um dos maiores da família Malpighiaceae, possuindo 150 espécies com distribuição marcadamente neotropical. Várias espécies do gênero *Byrsonima*, um dos maiores da família Malpighiaceae, com cerca de 150 indivíduos, têm diversas aplicações terapêuticas no território brasileiro. As folhas de algumas espécies desse gênero são utilizadas contra febre, úlceras gastrointestinais, como diurético, como antiasmático e em infecções de pele (GUILHON-SIMPLICIO; PEREIRA et al., 2011).

Algumas espécies desse gênero tiveram diversas atividades biológicas comprovadas cientificamente. Apenas nos últimos três anos, foram detectadas atividade antibacteriana, antimicótica, leishmanicida, antioxidante, antidiarréica, antiúlcera e antituberculose (HIGUCHI et al., 2008; LIMA, Z, 2008; MICHELIN, 2008). *Byrsonima japurensis* conhecida popularmente como muruci ou sara tudo, é uma representante amazônica estudada farmacologicamente, onde foi

comprovada a atividade anti-inflamatória e analgésica de uma extrato aquoso da casca do caule (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2012).

3.2 Dor

Dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tissular real ou potencial e descrita em termos de tal dano. A dor aguda é um alerta de que algo no organismo não está bem e está relacionada a afecções traumáticas, queimaduras, infecções e processos inflamatórios, entre outras. (CALIL et al., 2005)

Esse conceito envolve dois componentes: a nocicepção e a percepção, entretanto, ainda é uma das principais queixas de pacientes. A percepção da dor é a integração funcional dos sinais da via da dor, modulado por condições psicológicas, motivacionais e emocionais, além da história individual. A nocicepção ou a sensação nociceptiva resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos que transmitem a informação nociceptiva para o cordão espinhal, sendo retransmitido até córtex (VERRI et al., 2006).

Ela não é apenas um incômodo, mas envolve complexas reações fisiológicas, com manifestações autonômicas e psicológicas que levam à imunossupressão, à diminuição da perfusão tissular, ao aumento do consumo de oxigênio e do trabalho cardíaco, ao espasmo muscular, à alteração da mecânica respiratória e à liberação dos hormônios do estresse, culminando no aumento do catabolismo e alteração do balanço nitrogenado (CALIL et al., 2005)

Embora o tálamo e outros núcleos do sistema nervoso central, associados com a dor, não sejam ricos em COX I ou COX II, o cordão espinhal parece ser um local do processo nociceptivo que é intensamente influenciado pela COX II. Constitutivamente presente no cérebro e no cordão espinhal, a COX II está envolvida na transmissão nervosa, principalmente de estímulos dolorosos e febris (VANE et al., 1998; SHIN et al., 2006).

Na dor inflamatória, as PGs são produzidas nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais e causam hiperalgesia, o que é acompanhado da produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-8 e TNF α) e pela indução de COX II nas células inflamatórias, bem como, nos terminais nervosos próximos destas (VANE et al., 1998).

As citocinas e quimiocinas são mediadores liberados por células locais ou que migraram para área inflamada, modulando a intensidade da resposta. O estímulo inflamatório ou a lesão tecidual promove a liberação de citocinas, que disparam a liberação dos mediadores finais, que são prostanoídes e aminas simpatomiméticas, responsáveis pela resposta de dor (VERRI et al., 2006). Dessa forma, a dor periférica é iniciada pela endotelina, substância P, histamina e pela bradicinina, sendo ampliada pela ação das prostaglandinas (PGs), principalmente a prostaglandina E2 (PGE2) e a prostociclina (PGI2) através de sua ligação a receptores nociceptivos. A PGI2 está relacionada com a hiperalgesia imediata e de curta duração, enquanto a PGE2 se relaciona com a hiperalgesia longa, que pode persistir por até 6 horas (SPINOSA et al., 2006).

O acúmulo local de prostaglandinas, tromboxanos e outros mediadores químicos como as aminas simpatomiméticas e a substância P atuam nos nociceptores sensitivos primários (NSP), induzindo a sua sensibilização. Essa resposta decorre da diminuição do limiar de dor, devido à modulação de canais de sódio dependentes de voltagem específicos. Neste estágio, os animais experimentam então uma hiperalgia que se caracteriza pela sensibilidade exacerbada ao estímulo nocivo e/ou alodinia, quando sensações não dolorosas passam então a serem experimentadas como dor. Estes nociceptores sensibilizados enviam sinais, via fibras nervosas aferentes A delta e C, para o corno posterior da medula, onde fazem sinapses principalmente com neurônios das lâminas I, II e V. A partir da medula, o estímulo doloroso ainda prossegue via trato espinotalâmico para estruturas como o tálamo e, posteriormente, córtex cerebral (região parietal posterior), quando ocorre então a percepção da dor. Os estímulos nociceptivos também se dirigem para o sistema límbico (amígdala), que determina o aspecto afetivo da dor. (FERREIRA, 2009).

3.3 Analgésicos

Há centenas de anos os analgésicos são utilizados como medicamento e também como diversão. Os opiáceos, que são originalmente derivados da papoula tem como sua substância mais ativa a morfina, nomeada assim por causa de Morfeu, o deus dos sonhos grego. A morfina é um analgésico muito potente, mas é também muito viciante (HOSKIN; HANKS, 1991).

O arsenal farmacológico para o tratamento da dor é composto por opióides, os quais abolem diretamente a transmissão nociceptiva no sistema nervoso central pela ligação em receptores opióides (HOSKIN; HANKS, 1991), e por fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) que previnem a sensibilização de receptores periféricos e centrais da dor inibindo a ciclo-oxigenase (CASHMAN, 1996).

Os analgésicos opióides como a morfina e codeína são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, que não respondam a analgésicos menos potentes. Embora os opióides sejam muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (HOSKIN; HANKS, 1991).

Conhecidos pela humanidade há cerca de 100 anos, os AINE estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática médica. Constituem-se um grupo heterogêneo de compostos, que apesar de compartilharem do mesmo mecanismo de ação, tem fórmula estrutural e propriedades químicas bem diferentes (GAITAN et al., 2004). Inibem o sítio ativo da enzima cicloxigenase, levando a não formação de prostanoídes (HAZEWINKEL et al., 2008), apresentando, assim, um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares (KUMMER et al., 2002).

Os AINE têm vantagens sobre os analgésicos opióides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico (NUKI, 1983; RAINSFORD; VELO, 1992). Trabalhos recentes demonstram que as AINE atuam no sistema nervoso central, inibindo a hipersensibilidade espinhal e ativando mecanismos inibitórios descendentes da nocicepção, por mecanismos dependentes de prostaglandinas (OLIVEIRA, 2003).

4 METODOLOGIA

4.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas da espécie *Byrsonima duckeana* foram coletadas na Reserva Florestal Adolpho Ducke, em Manaus, Amazonas, pertencente ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) em 13 de novembro de 2010, às 09 h 15 min, pelo mateiro Everaldo da Costa Pereira. A espécie foi taxonomicamente identificada por Alberto Vicentini e W. R. Anderson no âmbito do projeto “Flora da Reserva Ducke” no qual possui o número de registro 2703 (Figura 1).

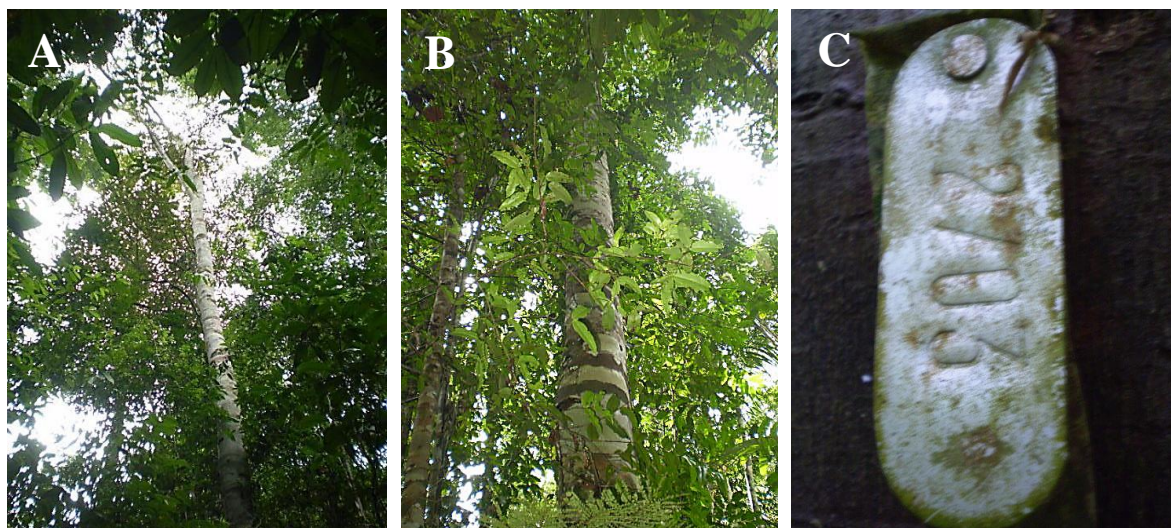


Figura 1. *Byrsonima duckeana* W. R. Anderson. A – Fotografia da espécie no local de coleta; B – Detalhe do tronco de *B. duckeana*. C – Placa de identificação de *B. duckeana* na Reserva Ducke.

4.2 Preparação da matéria prima vegetal e obtenção dos extratos e frações

As amostras de folhas de *B. duckeana* foram secadas à temperatura ambiente por sete dias e então encaminhada ao Laboratório de Farmacobotânica da Universidade Federal do Paraná (UFPR), onde foram levadas à estufa com circulação de ar para mais um ciclo de secagem. Em seguida, as folhas foram moídas em moinhos de facas e martelos dando origem à matéria prima vegetal (MPV) que foi então conservada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz até a extração. A MPV foi submetida ao processo de extração em Soxhlet modificado (CARVALHO, 2001,

método patenteado), utilizando etanol como solvente. O extrato etanólico bruto foi então submetido à partição líquido-líquido com hexano, diclorometano e acetato de etila, subsequentemente, totalizando quatro amostras, das quais cerca de 5 g foram remetidas via Correios para a realização dos testes.

4.3. Animais utilizados no estudo

Camundongos Swiss albinos de ambos os sexos foram obtidos do Biotério do INPA. Antes de cada teste, os animais foram ambientados no local de experimentação, por no mínimo, 48 horas. Água e ração balanceada foram fornecidos *ad libitum*, sendo que a alimentação foi suspensa 8 horas antes da administração oral de amostras. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal do Amazonas (CEEA-UFAM) sob o registro 028/2011 – CEEA.

4.4. Avaliação de toxicidade aguda

Cinco grupos contendo oito camundongos (quatro machos e quatro fêmeas) receberam a dose limite de 2000 mg/kg do extrato bruto e frações por via oral (gavagem). Após administração das drogas, todos os animais foram observados continuamente nas primeiras quatro horas e diariamente durante 14 dias, e parâmetros de alterações comportamentais e fisiológicas foram observados (*screening* hipocrático) segundo Malone e Robichaud (1962). No grupo Controle Negativo, que também continha 8 animais (quatro machos e quatro fêmeas), os animais receberam soro fisiológico em um volume médio em comparação ao volume administrado aos outros grupos sendo submetidos à mesma análise (Figura 2). Não foi utilizado nenhum controle positivo nesse teste.

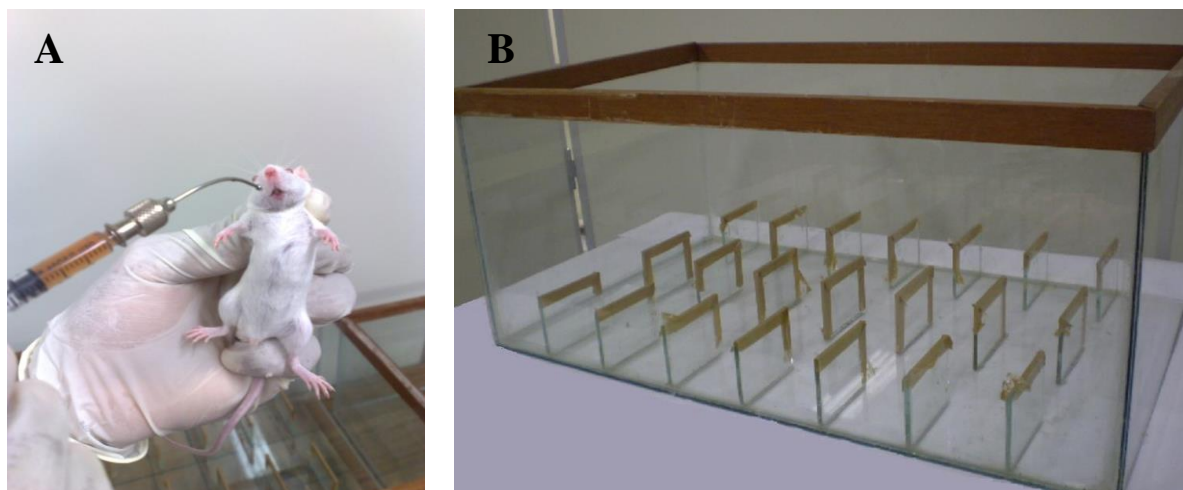


Figura 2. Análise da toxicidade aguda. A – Administração das amostras por gavagem; B – Campo de observação dos animais nas primeiras quatro horas da análise.

4.5 Teste das contorções abdominais

Neste teste foram utilizados seis grupos de camundongos contendo seis animais, três machos e três fêmeas. Quatro diferentes grupos receberam por via oral (gavagem), 100 mg/kg de cada amostra (extrato etanólico, fração hexano, fração diclorometano e acetato de etila). O grupo controle positivo recebeu indometacina 10 mg/kg e o grupo controle negativo recebeu soro fisiológico. Após 60 minutos da administração oral de todas as amostras, todos os camundongos receberam uma injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético a 1% em soro fisiológico. As contorções abdominais foram contadas cumulativamente durante os 20 minutos subsequentes à injeção, e o número acumulado total neste período foi tomado como índice da resposta nociceptiva, sendo os grupos testes comparados aos grupos negativo e positivo pelo teste T pareado (FERREIRA, 2012).

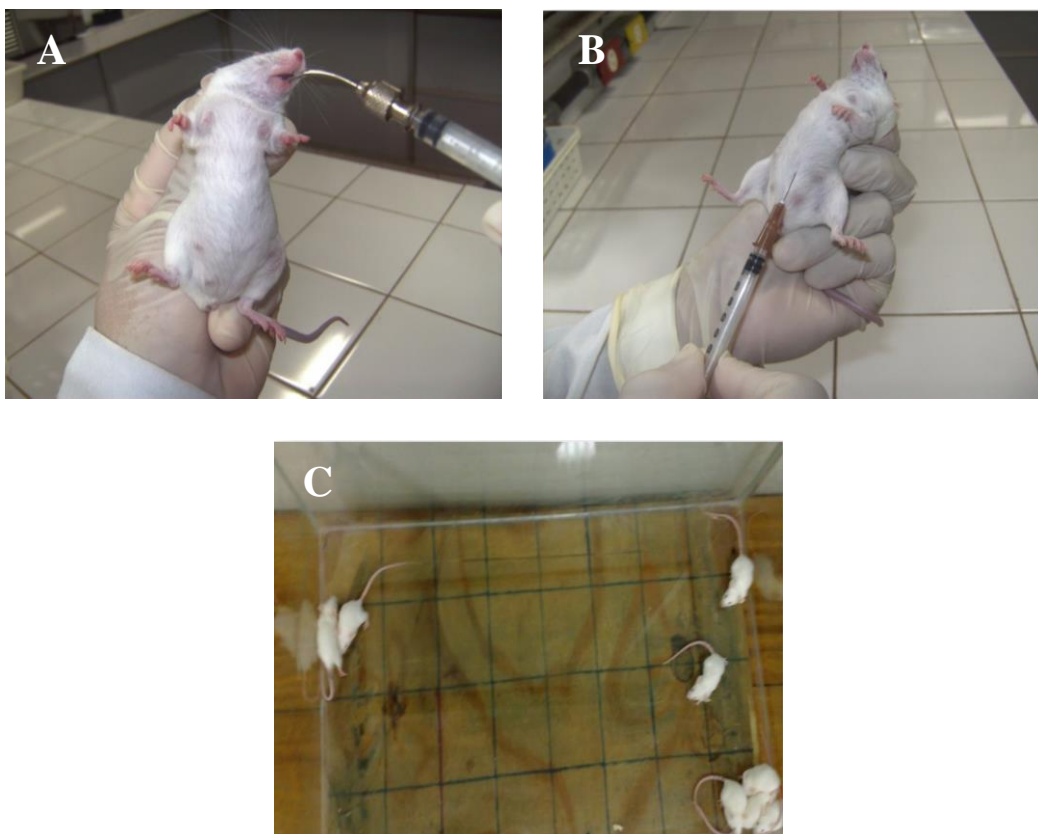


Figura 3. Teste das contorções abdominais. A – Administração das amostras pela via oral (gavagem); B – Aplicação de ácido acético a 1% pela via intraperitoneal. C – Contagem das contorções abdominais em campo aberto.

4.6 Teste da placa quente

Os camundongos foram divididos em grupos contendo 3 machos e 3 fêmeas. Doses de 5, 50 e 200 mg/kg da fração acetato de etila foram administradas por via oral em diferentes grupos. Outros grupos receberam 10 mg/kg de indometacina (controle positivo) e soro fisiológico (controle negativo). Os animais foram alocados individualmente em uma placa quente digital (EFF-361, Insight®) previamente aquecida a 52 ± 2 °C no tempo de 0 (para a obtenção dos valores basais) e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração das drogas (FERREIRA, 2012). Os dados de cada grupo foram comparados pelo teste de Student-Newman-Keuls para avaliar se houve aumento significativo ($p < 0,05$) no tempo de latência para a manifestação do reflexo de dor (Figura 4).



Figura 4. Teste placa quente. A – Obtenção dos valores basais do tempo de latência para a reação ao contato com uma placa aquecida a 52° C; B – Aplicação oral das amostras. C – Avaliação da resposta em Resposta avaliada em 30, 60, 120 e 180 min após a administração das amostras.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

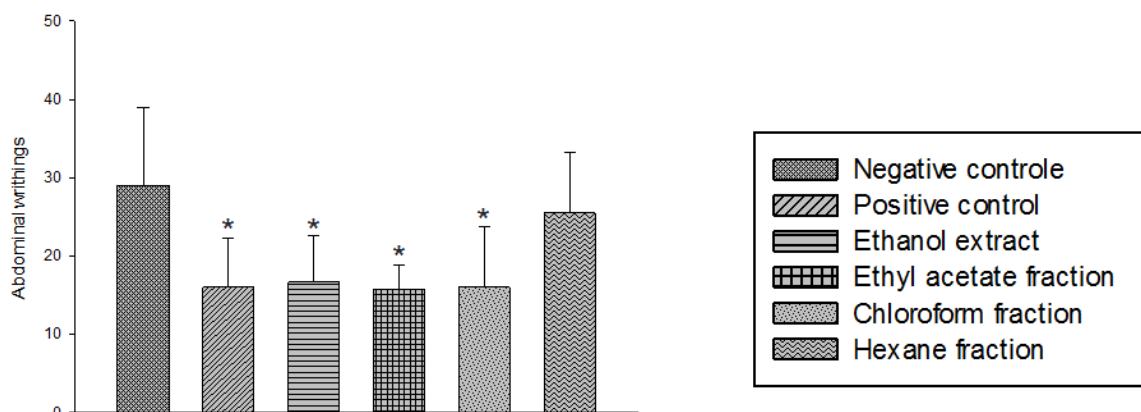
Antes da administração nos animais, o extrato bruto e as frações foram submetidos ao teste solubilidade para determinar o solvente ou mistura de solventes, adequados para administração oral em animais, seria utilizado nos testes *in vivo*. Após algumas tentativas, chegamos à conclusão que o Tween 20,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

No teste de toxicidade aguda, não houve mortes nos grupos dos animais que receberam o extrato etanólico bruto e as frações, por esse motivo a 50% (DL₅₀) não pode ser calculada. Também não foram observados sinais macroscópicos de toxicidade em nenhum dos animais. Sendo assim, assume-se que as amostras testadas podem causar alguma toxicidade somente em doses acima de 2000 mg/kg, que é uma dose praticamente inviável e portanto, podem ser consideradas seguras para administração pela via oral. Esse resultado reafirma a observação de Guilhon-Simplicio e Pereira (2011) de que *Byrsonima* spp. são relativamente seguras para estudos *in vivo*, reforçando o potencial farmacológico promissor do gênero. Sendo assim, todas as amostras seguiram para o teste seguinte, onde o objetivo era selecionar aquele com potencial analgésico mais promissor.

As contorções abdominais em camundongos caracterizam-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou de ambas as patas traseiras. O ácido acético é um estímulo conveniente para os testes de triagem por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos que determinam a nocicepção, sendo, portanto, sensível a substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica, com os mais variados mecanismos de ação (LAPA et al., 2008).

Para realizar a triagem das amostras no teste das contorções abdominais, foi selecionada a dose de 100 mg/kg, que é uma dose comumente utilizada em estudos de atividade farmacológica *in vivo* de extratos brutos e frações não purificadas de amostras vegetais. A análise de variância entre as médias da contagem de contorções em cada grupo, mostrou que o extrato bruto, e as frações diclorometano e acetato de etila tem atividade analgésica estatisticamente significativa, com valor de $p < 0,05$ em comparação ao controle negativo (soro fisiológico). Não foi encontrada diferença em relação ao controle positivo, podendo então se afirmar que as atividades são equivalentes. Nesse teste, a fração hexano não apresentou atividade analgésica e foi automaticamente excluída da próxima análise (Figura 5).

Figura 5. Contagem das contorções abdominais. Valor de p versus controle negativo: * $p < 0,05$.



O resultado desse teste permitiu observar que são os compostos de maior polaridade (extraíveis por acetato de etila e diclorometano) estão mais diretamente relacionados com atividade analgésica do extrato etanólico bruto. Tendo em vista que um dos objetivos do trabalho era indicar a fração mais promissora para posterior fracionamento fitoquímico, e considerando que as frações diclorometano e acetato de etila tiveram atividade semelhante (sem diferença estatística), a fração acetato de etila foi selecionada para o prosseguimento do trabalho, pela conveniência da solubilidade e de administração em animais de experimentação, visto que o diclorometano é um solvente clorado, também visando minimizar o uso de animais de

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

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

Neste estudo, a dose de 200 mg/kg da fração acetato de etila apresentou atividade significativa em relação ao controle negativo em todos os tempos analisados. Nos tempos de 90 e 120 minutos, todas as doses testadas apresentaram atividade analgésica. Nenhuma das doses apresentou diferença em relação ao controle positivo. A fração acetato de etila apresentou atividade analgésica equivalente à da droga padrão, mesmo com a menor dose testada, 5 mg/kg, que é metade da dose utilizada de indometacina, enfatizando que a mesma é uma promissora fonte de substâncias com atividade analgésica e, portanto, a mais indicada para o fracionamento fitoquímico dentre as amostras testadas.

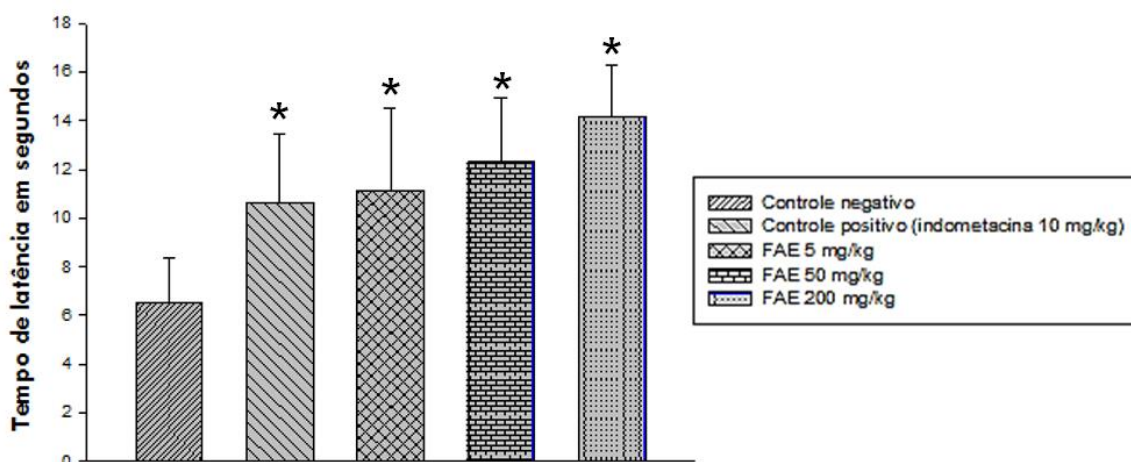


Figura 5. Média do tempo de latência para resposta ao estímulo doloroso, 90 minutos após a administração das drogas. Valor de *p* versus controle negativo: *p* < 0,05.

6. CONCLUSÕES

O presente trabalho mostrou que o extrato etanólico bruto das folhas de *B. duckeana* e suas frações diclorometano e acetato de etila, possuem atividade analgésica significativa e equivalente, o que permite inferir que essa atividade esteja relacionada aos compostos de mais alta polaridade presentes nas folhas, devendo esse ser o direcionamento do fracionamento fitoquímico do extrato em busca de substâncias biologicamente ativas. A segurança de uso dessas amostras por via oral, como também foi demonstrado neste trabalho, possibilita que esse fracionamento seja biomonitorado, a qual tem sido uma abordagem promissora para a descoberta de novos fármacos.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, J.S. **Bio (sócio) diversidade e empreendedorismo ambiental na Amazônia**. Rio de Janeiro: Garamond, 2003. 148p.

CALIL, A.M.; PIMENTA, C.A.M.; **Intensidade da dor e adequação de analgesia**. *Rev. Latino-Am. Enfermagem* [online]. 2005, vol.13, n.5, pp. 692-699. ISSN 0104-1169.

CARDOSO, C. R. P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niedenzu e *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae)**. 2006. 99f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.

CARVALHO, J. L. de C. **Contribuição ao estudo fitoquímica e analítico do *Nasturtium officinale* R. BR., Brassicaceae**. 2001. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Setor de Ciências da Saúde – Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

CASHMAN, J N. The mechanisms of action of NSAIDS in analgesia. **Drugs**, **52**: 13-23, 1996.

FERREIRA, S. H. Dor on line. Disponível em: www.dol.com.br. Acessado em: maio de 2012.

GIESE, S. O. K. **Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae)**. 2005. 83f. Dissertação (Mestrado em Química Orgânica) Setor de Ciências da Saúde - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade, fitoterápicos e fitofármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, 2007. 13-28.

GUILHON-SIMPLICIO, F. et al., Anti-inflammatory, anti-hyperalgesic, antiplatelet and antiulcer activities of *Byrsonima japurensis* A. Juss. (Malpighiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 282-86, 2012.

GUILHON-SIMPLICIO, F; PEREIRA, M. M. Aspectos químicos e farmacológicos de *Byrsonima* (Malpighiaceae). **Química Nova**, v. 34, n. 6, p. 1032-41, 2011.

HAZEWINKEL, H.A.W. et al. Comparison of the effects of firocoxib, carprofen and vedaprofen in a sodium urte crystal induced synovitis modelo of arthritis in dogs. **Research in Veterinary Science**, v.84, p.74-79, 2008.

HIGUCHI, C. T. et al. Triterpenes and antitubercular activity of *Byrsonima crassa*. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1719-21, 2008a.

HOSKIN, P J; HANKS, G W. Opioid agonist – antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, **41**: 326-344, 1991.

JANEWAY JUNIOR, C. A. et al. **Imunobiologia: o sistema imune na saúde e na doença**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. 824 p.

KUMMER ,C.L; COELHO, T. **Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais**. Revista Brasileira de Anestesiologia Vol. 52, Nº 4, Julho - Agosto, 2002.

LAPA, A. J. et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. 5. ed. São Paulo: UNIFESP/EPM, 2008. 144 p.

LIMA, Z. P. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, 149-60, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR, V. F. **Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares**. *Quim. Nova*, Vol. 25, No. 3, 429-438, 2002.

MALONE, M. H., ROBICHAUD, R. C., 1962. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320–322, 1962.

MORGAN, B. L. Overview of inflammation and coagulation. **Critical Care Concepts**, v. 12, 1-7, may 2007.

NUKI, G. Nonsteroidal analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal** **287**: 39-42, 1983.

OLIVEIRA, L F. In: CAVALCANTE I L; MADDALENA, M L. **Dor**. Rio de Janeiro: FARJ. p. 37-38, 2003.

SHIN, J.W. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs suppress pain-related behaviors, but not referred hyperalgesia of visceral pain in mice. **Anesth Analg**, v.102, p.195-200, 2006.

SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 239-272.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Research**, v. 2, 379-85, 2000.

TEIXEIRA, L. A. G.; MACHADO, I. C. Sistema de polinização e reprodução de *Byrsonima sericea* DC (Malpighiaceae). **Acta Botânica Brasileira**, v. 14, n. 3, 347-57, 2000.

VANE, J. R., BAKHLE, Y.S., BOTTING, R.M. Cyclooxygenase 1 and 2. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 38, p.97-120, 1998.

VERRI JR, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.

WALLACE, J.L., VONG, L. NSAID-induced gastrointestinal damage and the design of GI-sparing NSAIDs. **Current Opinion in Investigational Drugs**, v. 9, 1151-1156, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CACHINEL-FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, 147-52, 2001.



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

CERTIFICADO

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

Manaus, 04 de outubro de 2011


Prof. Fábio Tonissi Moroni
Presidente da CEEA-UFAM