



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SOCIEDADE, NATUREZA E
DESENVOLVIMENTO

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEORRESINA DE
COPAÍBA E DOS EXTRATOS DA ANDIROBA E JUCÁ PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO**

JOSÉ SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

Santarém - PA
Agosto de 2023

JOSÉ SOUSA DE ALMEIDA JÚNIOR

**ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEORRESINA DE
COPAÍBA E DOS EXTRATOS DA ANDIROBA E JUCÁ PARA O
DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO**

ORIENTADOR: PROF. DR. LAURO EUCLIDES SOARES BARATA

CO-ORIENTADOR: PROF. DR. WALDINEY PIRES MORAES

Tese apresentada à banca examinadora da
Universidade Federal do Oeste do Pará para
obtenção do título de Doutor. Área de
concentração: Sociedade, Natureza e
Desenvolvimento.

Santarém - PA
Agosto de 2023

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/UFOPA

A447e Almeida Junior, José Sousa de
Estudos pré-clínicos de segurança e eficácia do óleoresina de copaíba e dos extratos da andiroba e jucá para o desenvolvimento de um fitoterápico./ José Sousa de Almeida Junior. – Santarém, 2023.
191 p. : il.
Inclui bibliografias.

Orientador: Lauro Euclides Soares Barata.

Coorientador: Waldiney Pires Moraes.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento.

1. Copaifera reticulata. 2. Carapa guianensis. 3. Caesalpinia ferrea. 4. Jucá. 5. Copaíba. 6. andiroba. 7. Cicatrização. 8. Inflamação. 9. Antimicrobiano. I. Barata, Lauro Euclides Soares, *orient.*. II. Moraes, Waldiney Pires, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 615.321

Bibliotecária - Documentalista: Cátia Alvarez –CRB/2 843

ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEORRESINA DE COPAÍBA E DOS EXTRATOS DA ANDIROBA E JUCÁ PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO

Esta Tese será apresentada à banca julgadora para a obtenção do Título de Doutor pelo Programa de Pós-graduação em Sociedade, Natureza e Desenvolvimento da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA).

Apresentada à Comissão Examinadora, integrada pelos Professores: Prof. Dr. Antônio Humberto Hamad Minervino (Universidade Federal do Oeste do Pará - Ufopa), Prof. Dr. Bruno Alexandre da Silva (Universidade Federal do Oeste do Pará - Ufopa), Prof. Dr. Tiago Santos Silveira (Universidade Estadual do Pará - Uepa), Prof. Dr. Jarsen Luis Castro Guimarães (Universidade Federal do Oeste do Pará - Ufopa), Profa. Dra. Rayane Rocha Pereira, Profa. Dra. Tania Maria Pires Moraes como avaliadora substituta (Universidade Federal do Oeste do Pará - Ufopa).

Prof. Dr. Lauro Euclides Soares Barata (UFOPA)
Orientador

Prof. Dr. Waldiney Pires Moraes (UFOPA)
Co-Orientador

Santarém, 17 de agosto de 2023

DEDICATÓRIA

Dedico este árduo trabalho,
A Deus, a quem sempre busquei apoio
espiritual,

Aos meus pais José Sousa de Almeida
e Maria Antônia de Aguiar Almeida,

À minha esposa Kariane Aguiar, ao
meu filho José Antônio e Luisa Nazaré,

A todos os meus familiares e amigos
que se fizeram presentes e me deram apoio
para concluir o doutorado.

AGRADECIMENTOS

Aos professores Lauro Euclides Soares barata e ao Waldiney Pires Moraes, os quais contribuíram me orientando no percurso acadêmico desse doutorado.

Ao Prof. Dr. Humberto Minervino pelas contribuições no nosso grupo de pesquisa e apoio ao projeto, juntamente com seus alunos Flávio Assis e Poliana Leão.

Ao Prof. Dr. Valdir Veiga Júnior, Dra. Elaine C. Pacheco Oliveira, Prof. Dr. Eduardo Crevelin, Prof. Dra. Elen Aranha, Dra. Tania Moraes, Prof. Dr. Adilson Sartoratto pelo apoio e colaboração no desenvolvimento deste projeto de Tese.

Ao Biotério da Universidade Estadual do Pará, Campi Santarém, em nome do Prof. Dr. Tiago Silveira e Arilda Moraes pela cessão de espaço para alojamento e experimentos com os animais, e do aluno John Lennon que muito contribuiu com nosso projeto.

Ao Laboratório de Farmacotécnica, em nome da Profa. Dra. Kariane Mendes Nunes pela colaboração na preparação de nossa formulação, juntamente com sua aluna de mestrado, Amanda Esquerdo.

Aos alunos de mestrado e graduação que me ajudaram no desenvolvimento de meus métodos, Aline Moraes, Brayan Ferreira, Gleisson Willers, Poliana Peleja.

Aos meus amigos de trabalho Andresson Pontes e Danielle Ferreira que contribuíram para que conseguisse meu afastamento para cursar o doutorado.

“Nas grandes batalhas da vida,
o primeiro passo para a vitória é o
desejo de vencer.”

Mahatma Gandhi

ALMEIDA JÚNIOR, José Sousa. ESTUDOS PRÉ-CLÍNICOS DE SEGURANÇA E EFICÁCIA DO ÓLEORRESINA DE COPAÍBA E DOS EXTRATOS DA ANDIROBA E JUCÁ PARA O DESENVOLVIMENTO DE UM FITOTERÁPICO. 2023. 191 p. Projeto de Tese de Doutorado em Ciências Naturais. Programa de Pós-Graduação em Sociedade, natureza e Desenvolvimento. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2023.

RESUMO

A Amazônia é uma região rica em plantas medicinais onde há registros de pelo menos 1450 espécies. Alguns produtos têm grande destaque no cotidiano dos povos amazônicos, como é o caso da *Carapa guianensis* (andiroba), *Copaifera reticulata* (copaíba) e *Libidibia ferrea* (jucá), que em áreas de difícil acesso são muito utilizadas como remédios de primeira escolha numa alternativa à escassez de medicamentos. Assim, sabe-se que a etnofarmacologia tem dado origem a diversos produtos farmacêuticos hoje existentes, sejam eles fitoterápicos ou como produto para embasamento na construção de fármacos alopáticos. Dada a recorrente importância que a população Amazônica tem dado a estas três espécies, estudamos a segurança e eficácia do uso destes três importantes produtos naturais mais utilizados pelas populações tradicionais amazônicas associados em uma só formulação tópica, comprovando a segurança e eficácia de um novo fitoterápico antibacteriano. Para alcançar estes objetivos, foram realizadas a obtenção, identificação botânica e caracterização química das espécies estudadas. A fim de avaliar a segurança do produto, foram realizados vários testes que são preconizados por instituições reconhecidas internacionalmente, como ANVISA e OECD, como a determinação da toxicidade oral aguda, toxicidade dérmica aguda, toxicidade dérmica em doses repetidas, irritação/corrosão ocular *in vitro*, atividade citotóxica. Afim de comprovar a eficácia terapêutica da droga, foi avaliado o efeito antimicrobiano através do teste de micro diluição em placas. Adicionalmente foi realizada a obtenção da formulação semissólida a base de manteiga de *Astrocaryum murumuru* (murumuru). Diante dos estudos, foi observado que as drogas foram classificadas como de alto nível de segurança biológica nos testes de toxicidade. No teste de irritação ocular as drogas não demonstraram efeitos toxicológicos. A avaliação de citotoxicidade não apresentou resultados que fossem considerados tóxicos. Na avaliação da atividade antibacteriana, a associação das drogas promoveu efeito sinérgico. Na obtenção da formulação, foi observado a formação de cristais confirmando a compatibilidade farmacotécnica entre os produtos naturais testados. Portanto, a droga proposta por este estudo se mostrou segura para uso em todos os testes avaliados e com eficácia na atividade antibacteriana comprovada. Ainda mais, a associação dos três produtos naturais junto com a manteiga de murumuru demonstrou compatibilidade na formulação.

Palavras-chave: *Copaifera reticulata*, *Carapa guianensis*, *Caesalpinia ferrea*, jucá, copaíba, andiroba, cicatrização, inflamação, antimicrobiano.

ALMEIDA JÚNIOR, José Sousa. PRECLINICAL STUDIES ON THE SAFETY AND EFFECTIVENESS OF COPAÍBA OLEORRESIN AND ANDIROBA AND JUCÁ EXTRACTS FOR THE DEVELOPMENT OF A PHYTOTHERAPY. 2023. 191 p. Doctoral Thesis Project in Natural Sciences. Graduate Program in Society, Nature and Development. Federal University of Western Pará – UFOPA, Santarém, 2023.

ABSTRACT

The Amazon is a region rich in medicinal plants where there are records of at least 1450 species. Some products have great prominence in the daily lives of the Amazonian peoples, such as *Carapa guianensis* (andiroba), *Copaifera reticulata* (copaíba) and *Libidibia ferrea* (jucá), which in areas of difficult access are often used as first-choice remedies in an alternative to drug shortages. Thus, it is known that ethnopharmacology has given rise to several pharmaceutical products that exist today, whether they are herbal medicines or as a base product in the construction of allopathic drugs. Given the recurrent importance that the Amazonian population has given to these three species, we studied the safety and efficacy of the use of these three important natural products most used by traditional Amazonian populations associated in a single topical formulation, proving the safety and efficacy of a new antibacterial herbal medicine. . To achieve these objectives, the collection, botanical identification and chemical characterization of the studied species were carried out. In order to evaluate the safety of the product, several tests were carried out that are recommended by internationally recognized institutions, such as ANVISA and OECD, such as the determination of acute oral toxicity, acute dermal toxicity, dermal toxicity in repeated doses, in vitro eye irritation/corrosion, cytotoxic activity. In order to prove the therapeutic efficacy of the drug, the antimicrobial effect was evaluated through the microdilution test in plates. Additionally, a semi-solid formulation based on *Astrocaryum murumuru* butter (murumuru) was obtained. In view of the studies, it was observed that the drugs were classified as having a high level of biological safety in the toxicity tests. In the ocular irritation test, the drugs did not show toxicological effects. The cytotoxicity evaluation did not show results that could be considered toxic. In the evaluation of antibacterial activity, the combination of drugs promoted a synergistic effect. When obtaining the formulation, the formation of crystals was observed, confirming the pharmacotechnical compatibility between the tested natural products. Therefore, the drug proposed by this study proved to be safe for use in all tests evaluated and with proven antibacterial activity. Even more, the association of the three natural products together with murumuru butter demonstrated compatibility in the formulation.

Keywords: *Copaifera reticulata*, *Carapa guianensis*, *Libidibia ferrea*, jucá, copaiba, andiroba, cicatrization, inflammation, antimicrobial.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição geográfica da <i>Carapa guianensis</i> Aubl. no Brasil.	38
Figura 2 - Árvore de <i>Carapa guianensis</i> Aubl.	40
Figura 3 - (A) Fruto, (B) Sementes das espécies <i>Carapa guianensis</i> Aubl. e <i>Carapa procera</i> D.C. e (C) germinação da semente de <i>Carapa guianensis</i> Aubl., demonstrando a presença de folhas compostas.	41
Figura 4 - Coleta das sementes de andiroba, lavagem, fervura, quebra, formação do "pão de andiroba" e extração do óleo.	45
Figura 5 - Imagem ilustrativa de uma máquina extratora de óleo de andiroba "expeller".	46
Figura 6 - Regiões onde as espécies do gênero <i>Copaifera</i> são mais endêmicas. ...	51
Figura 7 - Folhas alternas em pares de folíolos de um ramo coletado na Floresta Nacional do Tapajós.	52
Figura 8 - Espécie de copaíba (<i>Copaifera reticulata</i>).	52
Figura 9 - Extração do óleo de copaíba em uma árvore de <i>C. reticulata</i> na FLONA do Tapajós.	54
Figura 10 - Imagens de <i>Libidibia ferrea</i> (Jucá). (A) Árvore do jucá. (B) Caule da árvore do jucá. (C) Detalhe das folhas do jucá. (D) As flores do jucá. (E) Inflorescência e frutos. (F) Detalhes de frutos e sementes.	63
Figura 11 - Normas aplicáveis ao registro e notificação de fitoterápicos.	96
Figura 12 - Documentação necessária para solicitar registro de MF e PTF na Anvisa.	96
Figura 13 - Fluxograma dos estudos experimentais.	113
Figura 14 - Extração do óleo do resíduo de andiroba.	114
Figura 15 - Mapa de localização da região de coleta das árvores de <i>Copaifera reticulata</i>	114
Figura 16 - Extração do óleoresina de <i>Copaifera reticulata</i>	115
Figura 17 - Extração do extrato de Jucá.	116
Figura 18 - Fluxograma da Toxicidade Aguda.	118
Figura 19 - Teste de Toxicidade dérmica aguda. (A) Rato Wistar com a droga aplicada na região dorsal do animal. (B) Rato Wistar após a remoção da substância teste.	119
Figura 20 - Fluxograma do teste de Toxicidade dérmica aguda.	120
Figura 21 - Procedimento experimental em sequência para desenvolvimento do método HET-CAM.	123
Figura 22 - Espectro da cromatografia realizada por UPLC MS/MS da <i>Carapa sp.</i>	128
Figura 23 - Os componentes majoritários sugeridos na constituição do extrato etanólico do resíduo da andiroba (<i>Carapa sp.</i>), seu percentual na amostra, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos.	129
Figura 24 - Espectro da cromatografia realizada por GC-MS da <i>Carapa sp.</i>	130

Figura 25 - Os componentes majoritários do extrato etanólico do resíduo da <i>Carapa sp</i> , seu percentual, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. O procedimento foi realizado em um cromatógrafo a Thermo Scientific, equipado com detector de massas (CG-MS), com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). Os constituintes químicos da andiroba foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007).	131
Figura 26 – Cromatograma dos compostos químicos presentes no óleo-resina de <i>C. reticulata</i> , obtido em GC-MS.	132
Figura 27 - Os componentes majoritários de óleo-resina de <i>C. reticulata</i> , seu percentual, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. O procedimento foi realizado em um cromatógrafo a Thermo Scientific, equipado com detector de massas (CG-EM), com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). Os constituintes químicos do óleo-resina foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007).	133
Figura 28 - Cromatograma dos compostos químicos presentes no extrato etanólico de <i>L. ferrea</i> obtido em UPLC-MS/MS.....	134
Figura 29 - Os componentes majoritários sugeridos na constituição do extrato etanólico das vagens da (<i>Libidibia ferrea</i>), seu percentual na amostra, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. A fórmula molecular do galotanino é representada pela fórmula do Ácido gálico multiplicado pela quantidade de molécula desse ácido que forma a cadeia do galotanino.	134
Figura 30 - Peso dos ratos submetidos ao tratamento no decorrer de 21 dias.	138
Figura 31 – Resultados do teste de HET-CAM em ovos embrionados. As Fotografias tiveram ajustes de temperatura para facilitar a visualização dos extravasamentos sanguíneos.....	146
Figura 32 - Resultados do Teste <i>in vitro</i> de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da <i>Carapa sp</i> . sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise ± Desvio Padrão).	147
Figura 33 - Resultados do Teste <i>in vitro</i> de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da <i>Copaífera reticulata</i> sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise ± Desvio Padrão).	148
Figura 34 - Resultados do Teste <i>in vitro</i> de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da <i>Libidibia ferrea</i> sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise ± Desvio Padrão).	148
Figura 35 - Formulação preparada com aspecto homogêneo e de cor esverdeada.	151
Figura 36 – Fotomicrografias em microscopia de Luz Polarizada (PLM) da formulação semissólida com Copaíba, andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru. (A) Fotomicrografia da formulação semissólida somente com manteiga de murumuru em objetiva de 10x. (B) Fotomicrografia da formulação semissólida com Copaíba,	

andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru em objetiva de 10x. (C) Fotomicrografia da formulação semissólida somente com manteiga de murumuru em objetiva de 20x. (D) Fotomicrografia da formulação semissólida com Copaíba, andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru em objetiva de 20x.151

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grau de reação da pele, segundo os critérios de Draize (1944).....	120
Tabela 2 - Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste.	123
Tabela 3 - Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.	123
Tabela 5 - Teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.....	135
Tabela 6 - Repetição do teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.....	136
Tabela 7 - Peso dos animais submetidos ao teste de Toxicidade Dérmica Aguda, conforme orienta o protocolo da OECD 402 (2017). Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2.000 mg/Kg.....	137
Tabela 8 - Peso dos animais submetidos à repetição do teste de Toxicidade Dérmica Aguda para confirmação, conforme orienta o protocolo da OECD 402 (2017). Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.....	137
Tabela 9 - Peso dos órgãos dos animais submetidos ao estudo da Toxicidade Dérmica em Doses Repetidas, conforme OECD 410 (1981). Os valores do Peso Relativo são expressos em percentual referente ao Peso médio dos animais no dia da eutanásia (% $\pm$ DP). A análise estatística realizada foi o de Anova two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$).	139
Tabela 10 - Evolução do consumo de ração pelos animais submetidos ao teste de Toxicidade Dérmica por doses repetidas no decorrer de 21 dias. Os dados são apresentados em peso (gramas $\pm$ DP). Cada grupo possui um n de 5 animais, que foram pesados no dia 1, 7, 14 e 21 do experimento. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$).	140
Tabela 11 - Parâmetros bioquímicos dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410, com n de 5 animais cada grupo. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ DP). A análise estatística realizada foi o de	

ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$). Albumina (Alb), Cálcio (Ca^{2+}), Creatinina (Cre), Fósforo (Fos), Glicose (Gli), Proteínas totais (Ptn), Transaminase oxalacética (TGO), Transaminase pirúvica (TGP), Uréia (Ure).142

Tabela 12 - Parâmetros hematológicos da série vermelha dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ Desvio Padrão). Cada grupo possui um n de 5 animais. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Turkey ($p < 0,05$).143

Tabela 13 - Parâmetros leucocitários dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ Desvio Padrão). Cada grupo possui um n de 5 animais. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$). Leucócitos (Leuc), Granulócitos (Gran), Linfócitos (Linf), Monócitos (Mon).144

Tabela 14 - Pontuação de irritação e classificação do produto conforme ao índice de irritação no teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane - HET-CAM). **** Diferença estatística apresentada quando comparada com o grupo controle Tween 1% ($p \leq 0,0001$; $n=5$). Os resultados foram expressos em Média ($\pm$ E.P.M.). ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Tukey.145

Tabela 15 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM) do óleo-resina de *C. reticulata* e do extrato etanólico do resíduo da prensagem das amêndoas de *Carapa sp.* e das vagens da *Libidibia ferrea*. Copanju (óleo-resina de *C. reticulata* e do extrato etanólico do resíduo da prensagem das amêndoas de *Carapa sp.* e das vagens da *Libidibia ferrea*).150

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

3R's	Replacement, reduction e refinement (Substituir, reduzir e refinar)
a.C	Antes de Cristo
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
BCOP	Ensaio de permeabilidade e opacidade corneal bovina
BraCVAM	Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos
BrdU	5-bromo-2-desoxiuridina
CAM	Membrana cório-alantóide
CB2	Receptor canabinóide tipo 2
CBM	Concentração bactericida mínima
CBPFC	Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle
CE	Comunicado Especial
CEUA	Comitês de ética de uso animal
Ciats	Centros de Informação e Assistência Toxicológica
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
COX-2	Ciclooxigenase 2
d.C	Depois de Cristo
DCB	Denominação Comum Brasileira
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DXP	1-desoxilulose-5-fosfato

EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EET	Encefalopatia Espongiforme Transmissível
EHS	Divisão de Meio Ambiente, Saúde e Segurança da OECD
ELISA	Enzyme linked immuno sorbent assay
EMA	European Medicines Agency
FDA	U. S. Food and Drug Administration
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FLONA	Floresta Nacional do Tapajós
FTM	Fitomedicamentos
GC-FID	Cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama
GC-MS	Cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa
GHS	Sistemas Internacionalmente Aceitos (Globally Harmonised System)
HC	Health Canada
HET-CAM	Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane/membrana corioalantóide
HMPC – EMA	Comitê de Fitoterápicos da Comunidade Europeia
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
IBDF	Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Federal
ICH	The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use
IFAV	Insumo farmacêutico ativo vegetal
IL-1	Interleucina 1
IL-10	Interleucina 10
INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INMETRO	Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
INPI	Instituto Nacional da Propriedade Industrial
IPP	Isopentenil difosfato

LDH	Lactato desidrogenase
LLNA	Ensaio de linfonodo local (Lymph Node Assay)
LNBio	Laboratório Nacional de Biociências
LPS	Lipolissacarídeos de <i>E. Coli</i>
MCTI	Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação
MDA	Malondialdeído
MHB	Caldo Mueller-Hinton
MPO	Mieloperoxidase
MRC-5	Fibroblastos humanos normais transformados por SV40
MS	Ministério da Saúde
MTT	3-(4,5 dimethyl thiazole-2yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide
NCEs	Novas entidades químicas
NHEK	Queratinócitos epidérmicos humanos normais
NID	Número de identificação de plantas no Herbário
NO	Óxido nítrico
NOAEL	Nível de dose sem observação de efeito adverso
NOEL	Nível de dose sem observação de efeito
NRU	Método de vermelho neutro (Neutral Red Uptake)
OCR	<i>Copaifera reticulata</i>
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Proteína C reativa
PGE 2	Prostaglandina E-2
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PVC	Policloreto de Vinila
RBC	Red blood cell

RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
Renaciat	Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica
RENAMA	Rede Nacional de Métodos Alternativos
RENISUS	Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RPMI	Meio de cultura celular "Roswell Park Memorial Institute"
SE	Segurança e Eficácia
SI	Sistema Internacional de unidades
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-farmacológicas
SUS	Sistema Único de Saúde
TER	Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (In vitro skin corrosion – Transcutaneous Electrical Resistance Test)
TGA	Therapeutic Goods Administration
TGF- β	Fator de crescimento transformador Beta
TH1	Resposta imune TH1
TNF- α	Fator de necrose tumoral α

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO:	22
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	27
2.1. Produtos Naturais e a Etnofarmácia	27
2.2. Plantas Medicinais	30
2.2.1. <i>Carapa sp</i> (Andiroba)	37
2.2.2. <i>Copaifera reticulata</i> (Copaíba)	49
2.2.3. <i>Libidibia ferrea</i> (Jucá)	60
2.3. Toxicidade de Plantas Medicinais	66
2.3.1. Estudos toxicológicos relacionado à Andiroba	68
2.3.2. Estudos toxicológicos relacionado à Copaíba	71
2.3.3. Estudos toxicológicos relacionado ao Jucá	73
2.4. Atividade farmacológica das plantas medicinais	76
2.4.1. Atividade antimicrobiana das Plantas Medicinais	77
2.4.1.1. Atividade antimicrobiana da Andiroba (<i>C. guianensis</i>)	78
2.4.1.2. Atividade antimicrobiana da Copaíba (<i>C. reticulata</i>)	80
2.4.1.3. Atividade antimicrobiana do Jucá (<i>L. ferrea</i>)	83
2.5. Produção e Desenvolvimento de Fitoterápicos	90
2.5.1. Regulação: Aspectos legais na regulação de medicamentos fitoterápicos no Brasil na etapa pré-clínica	94
2.5.2. Aspectos éticos envolvidos na experimentação animal para desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e as alternativas experimentais	100
2.5.3. Uso de métodos experimentais alternativos ao uso de animais	102
3. JUSTIFICATIVA	109
4. OBJETIVO	111
5. MATERIAL E MÉTODOS	112
5.1. Animais	112
5.2. Desenho Experimental	112
5.3. Coleta, identificação e extração do Material Vegetal	113
5.3.1. Andiroba (<i>Carapa sp.</i>)	113
5.3.2. Copaíba (<i>Copaifera reticulata</i>)	114

5.3.3. Jucá (<i>Libidibia ferrea</i>)	115
5.4. Caracterização química	116
5.4.1. Caracterização química do extrato etanólico do resíduo da <i>Carapa sp.</i> óleorresina de <i>Copaifera reticulata</i> por cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas.....	116
5.4.2. Caracterização química do extrato etanólico do resíduo das Andiroba e das vagens Jucá por UPLC-MS/MS	116
5.5. Ensaios de Segurança - Toxicidade	117
5.5.1. Toxicidade oral aguda	118
5.5.2. Toxicidade dérmica aguda em ratos.....	118
5.5.3. Toxicidade dérmica em doses repetidas <i>in vivo</i>	121
5.5.4. Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda <i>in vitro</i>	121
5.5.5. Citotoxicidade	123
5.6. Ensaios de Eficácia - Avaliação da atividade antimicrobiana.....	124
5.6.1. Microorganismos e condições de cultivo	124
5.6.2. Método de microdiluição em caldo - Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (CLSI, 2006).	124
5.7. Obtenção da formulação semissólida a base de manteiga de <i>Astrocaryum murumuru</i> Mart. contendo óleorresina de <i>Copaifera reticulata</i> e os extratos etanólico de <i>Carapa sp.</i> e <i>Libidibia ferrea</i>.	126
5.7.1. Identificação de fase mesomórfica por microscopia de luz polarizada (MLP)	126
5.8. Análise de dados.....	127
6. RESULTADOS	127
6.1. Extração de produtos naturais.....	127
6.1.1. <i>Carapa sp</i>	127
6.1.2. <i>Copaifera reticulata</i>	127
6.1.3. <i>Libidibia ferrea</i>	127
6.2. Caracterização Química.....	128
6.2.1. Andiroba (<i>Carapa sp.</i>)	128
6.2.1.1. Caracterização química da Andiroba por UPLC-MS/MS	128
6.2.1.2. Caracterização química da Andiroba por GC-MS.....	130

6.2.2.	Copaíba (<i>Copaifera reticulata</i>).....	131
6.2.3.	Jucá (<i>Libidibia ferrea</i>)	134
6.3.	Ensaio de Segurança	135
6.3.1.	Toxicidade oral aguda	135
6.3.2.	Toxicidade dérmica aguda.....	136
6.3.3.	Toxicidade dérmica em doses repetidas	137
6.3.3.1.	Peso dos animais:	137
6.3.3.2.	Necrópsia e Peso de órgãos	139
6.3.3.3.	Consumo de ração	140
6.3.3.4.	Comportamento dos animais.....	141
6.3.3.5.	Parâmetros bioquímicos	141
6.3.3.6.	Parâmetros hematológicos	143
6.3.4.	Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda in vitro (HET-CAM)	145
6.3.5.	Citotoxicidade	146
6.4.	Ensaio de Eficácia - Atividade antimicrobiana	148
6.5.	Obtenção da formulação semissólida a base de manteiga de <i>Astrocaryum murumuru</i> Mart. contendo óleoresina de <i>Copaifera reticulata</i> e os extratos etanólico de <i>Carapa sp.</i> e <i>Libidibia ferrea</i>.	150
7.	DISCUSSÃO	152
8.	CONCLUSÃO.....	168
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	170
10.	ANEXO I – CERTIFICADO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS...192	

1. INTRODUÇÃO:

O uso de produtos naturais como método profilático e terapêutico pelo homem é tão antigo quanto a história da humanidade e se perpetua hereditariamente até os dias atuais. Esse conhecimento surgiu, à medida que o ser humano buscava suprir suas necessidades básicas através de casualidades, observações e tentativas, havendo relatos de seu uso em diversas civilizações da antiguidade (FREIRE et al., 2018; GARCIA & YAMAGUCHI, 2012).

Muitos são os produtos naturais que são aplicados como fonte de alimento, fragrâncias, pigmentos, inseticidas e medicamentos (C. A. M. ROCHA et al., 2020). No campo dos medicamentos, as aplicabilidades terapêuticas são as mais diversas, como antiinflamatória, analgésica, antimalárica, antibiótica, entre outros. Dentre os produtos com fins terapêuticos, as plantas se destacam por ser fonte de metabólitos secundários, moléculas bioativas com potencial farmacológico (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001).

No campo da indústria farmacêutica de medicamentos alopáticos, os metabólitos secundários de plantas servem de espelho molecular para produção de novas substâncias sintéticas por meio da modelagem molecular, modificando funções químicas e aprimorando as características bioquímicas e farmacológicas (CALIXTO, 2000; FILHO, 2010; VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005).

Ultimamente no Brasil tem havido aumento na pesquisa de plantas como fonte de utilidades cotidianas, principalmente na busca por novos medicamentos com aplicabilidade para fins profiláticos ou para combater algumas enfermidades (RONDON et al., 2012). Assim, a medicina tradicional tem colaborado com o surgimento de novas drogas que são utilizadas atualmente no tratamento de diversas doenças. Alguns desses produtos se inserem na classe dos fitoterápicos, que são os medicamentos industrializados obtidos por intermédio do emprego exclusivamente de derivados de drogas vegetais (IBIAPINA et al., 2014).

Ressaltando a importância da etnofarmacologia na Pesquisa & Desenvolvimento de novos fármacos, vale destacar a história da descoberta da artemisinina. A *Artemisia annua* L. é um vegetal muito conhecido pela medicina tradicional chinesa devido seu efeito na febre e malária. Seu uso terapêutico contra o plasmódio foi referenciado pela primeira vez nas “52 prescrições” que foram redigidas

durante a dinastia Mawangdui Han que reinava na China de 206 a.C. a 220 d.C (ALVES, 2013; WOERDENBAG; LUGT; PRAS, 1990).

Em meados dos anos 60, com o surgimento de cepas de *Plasmodium falciparum* resistentes à cloroquina no sudeste asiático, deu sinal de alerta ao governo chinês para o problema sanitário com a malária. Então, no ano de 1967 foi criado o Comitê Diretor Nacional de Pesquisa Antimalária e em 1969 foi estabelecido o programa de descoberta de medicamentos antimaláricos, este último incentivado durante a guerra do Vietnã do Norte e denominado Projeto 523. Nessa ação, pesquisadores chineses realizaram testes em centenas de plantas medicinais chinesas e como resultado dessas pesquisas, em 1972 chegou ao isolamento de uma fração com atividade antimalárica de *Artemisia annua* L., a artemisinina ou *qinghaosu*. Somente no ano de 1979 foi que essa nova droga teve sua estrutura descoberta e se tratava de uma lactona sesquiterpênica com uma ponte de peróxido. Diante destes aspectos a artemisinina tornou-se um medicamento antimalárico promissor, devido à sua atividade contra cepas resistentes de *P. falciparum* e sua eficácia contra a malária cerebral (DALRYMPLE, 2013; WOERDENBAG; LUGT; PRAS, 1990).

A fitoterapia ainda apresenta grande importância visto que mais de 25% dos fármacos comercializados são derivados de matrizes vegetais (C. A. M. Rocha et al., 2020). O uso crescente desses produtos de plantas *in natura* ou de fitoterápicos se deve à sua eficiência, baixa toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo, como relatado por Tobouti et al., (2017). No entanto, a escolha dessa terapia necessita de cuidados, pois a sua administração inadequada pode originar problemas graves à saúde decorridas de alterações nas funções orgânicas ou interferência na ação de uma droga utilizada simultaneamente com o fitoterápico (VALDIR & PINTO, 2002; VERRENGIA et al., 2013). Devido a extensa aplicabilidade farmacológica dos produtos de origem vegetal, surgiram interesses da indústria farmacêutica para o desenvolvimento de novos fármacos mais especializados, mas que se tornam necessário cada vez mais pesquisas para a avaliação da sua segurança e eficácia (LOURENÇO et al., 2009).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), cerca de 80% da população utiliza as plantas medicinais como alternativa terapêutica. Assim, o mercado financeiro dos fitoterápicos, a nível mundial, movimenta cerca de US\$ 22 bilhões de dólares por ano, o equivalente a 3% do mercado mundial de medicamentos em geral. No Brasil,

este mercado está estimado em US\$ 400 milhões por ano, aproximadamente 5% do mercado nacional de medicamentos (ALVES NETO; VALADARES; COSTA, 2020).

A França, Japão e Alemanha arrecadam muito mais que o Brasil quando o tema é comercialização de produtos fitoterápicos. Cifras acima de US\$ 5 bilhões ao ano é o que o brasileiro deixa de produzir por não ter a transformação da biodiversidade em remédios. Essa comparação se torna discrepante visto que o país sulamericano com maior potencial biotecnológico mundial, não acompanhar grandes economias que não se destacam com a presença de grande biodiversidade comparadamente (FERREIRA; BARATA, 1998).

O marco histórico no desenvolvimento da indústria farmacêutica mundial foi a descoberta da salicina (analgésica e antipirética) por Raffaele Piria, em 1832, a partir da planta *Salix alba*. Em 1839, foi realizada a primeira modificação estrutural da salicina, produzindo ácido salicílico para ser usado no tratamento da artrite reumatóide. A partir do ácido salicílico, Felix Hoffman sintetizou a aspirina (ácido acetilsalicílico) em 1897. Assim nasceu a famosa e poderosa indústria farmacêutica Bayer na Alemanha, assim como a primeira patente na área de medicamentos (DUTRA et al., 2016).

Até meados da década de 1990, não havia regulamentação específica para a classe desses produtos no Brasil; entretanto, esse cenário mudou nos últimos 20 anos com a publicação da regulamentação sanitária para registro de fitoterápicos (MARTIM; MARANHO; COSTA-CASAGRANDE, 2021). O Ministério da Saúde do Brasil (MS) se destacou pelo fato de legitimar a prática da fitoterapia com a instituição da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e regulamentou a implementação no Sistema Único de Saúde da aplicação terapêutica das plantas medicinais em meados do ano de 2006 (ALVES NETO; VALADARES; COSTA, 2020).

Atendendo a importância que as plantas medicinais representam para a saúde da população brasileira, no ano de 2004 o laboratório brasileiro Aché desenvolveu um medicamento contendo óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC, registrado na ANVISA e que está entre os 20 principais produtos Fitoterápicos mais comercializados no Brasil. Entretanto, plantas importadas de outros países, como europeias e africanas, fazem parte dos outros 19 produtos. Este lançamento se torna um marco histórico para a fitoterapia brasileira por ser considerado o primeiro medicamento fitoterápico brasileiro, com pesquisas realizadas no país, com registro na Agência

Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e contou com a participação de 100 pesquisadores de diferentes áreas no decorrer dos sete anos de pesquisas e com cerca de US\$ 5 milhões de dólares de investimento. O Acheflan® (Aché Laboratórios Farmacêuticos, Guarulhos, Brasil), nome comercial deste medicamento, tem seu efeito atribuído aos metabólitos secundários da *Cordia verbenacea* DC (Erva Baleeira), α -humuleno e cariofileno, que também estão presentes na composição do óleorresina de copaíba (SANTOS et al., 2020a). Essas substâncias atuam de forma sinérgica na redução da síntese de Prostaglandina E-2 (PGE 2), bem como a expressão de ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS). No medicamento, as preparações são formuladas com 0,5% do óleo essencial de *C. verbenacea* (BALBANI ET AL., 2009; CECHINEL-ZANCHETT, 2016; DUTRA ET AL., 2016; GOMES ET AL., 2019; MARTIM ET AL., 2021).

Nos ensaios pré-clínicos e clínicos de Fase I, II e III foram evidenciadas a excelente atividade antiinflamatória e ótima tolerabilidade do Acheflan quando aplicado na pele por três vezes ao dia no tratamento de tendinite e dor miofascial, contusões agudas, entorses, traumas e lesões musculares, com eficácia superior à do diclofenaco dietilamônio a 1% para tendinite crônica (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009).

No entanto, antes de um medicamento fitoterápico ser autorizados pelos órgãos competentes, várias são as etapas do processo para regulação deste fármaco. O registro é concedido quando a qualidade, eficácia e segurança do produto, bem como as boas práticas de fabricação, atendem aos critérios da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, como as etapas pré-clínicas e clínicas que são determinadas pela Anvisa atendendo a Resolução Nº 26, de 13 de maio de 2014 e do Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009).

Até 2011, havia regularizado na Anvisa 382 medicamentos fitoterápicos, sendo que deste número, 74 eram medicamentos fitoterápicos simples e 43 como medicamentos fitoterápicos compostos. Dentre as espécies com maior número de registros como medicamentos fitoterápicos a castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum*), guaco (*Mikania glomerata*), ginkgo (*Ginkgo biloba*), Alcachofra (*Cynara scolymus*), Sene (*Cassia angustifolia*, *Cassia senna* e *Senna alexandrina*), Valeriana (*Valeriana officinalis*), Maracujá (*Passiflora incarnata*), Boldo (*Peumus*

boldus), Espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia*), Ginseng (*Panax ginseng*), Psílio (*Plantago psyllium*), Hipérico (*Hypericum perforatum*), Soja (*Glycine max*), Guarra do diabo (*Harpagophytum procumbens*), Cáscara sagrada (*Thamnus purshiana*). Uma informação muito importante é que dos 19 produtos fitoterápicos mais comercializados no Brasil, 18 são de origem europeia ou africana, constando nesta lista somente o Acheflan (CECHINEL-ZANCHETT, 2016).

Mesmo a Amazônia sendo uma região rica em biodiversidade e fonte de plantas medicinais, nenhum produto de origem amazônica consta na lista de produtos fitoterápicos mais comercializados e nem na lista de produtos fitoterápicos já industrializados. Nesta região existem alguns produtos que são muito difundidos popularmente e que se destacam pelo seu potencial biológico, como as espécies *Copaífera reticulata* (Copaíba), *Libidibia ferrea* (Jucá) e *Carapa sp* (Andiroba). Estas plantas são muito relatadas pelos povos tradicionais por apresentar atividades antibacteriana. Entretanto, ainda não existe nenhum medicamento fitoterápico no Brasil a base dessas plantas medicinais oriundas da medicina tradicional da Amazônia.

Com base no uso de produtos naturais para cura de diversas enfermidades e o conhecimento popular bastante difundido desses produtos naturais citados, este trabalho aborda o estudo químico, toxicológico e propriedades farmacológicas de três espécies encontradas na Amazônia para a obtenção de uma formulação que com estes produtos naturais.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Produtos Naturais e a Etnofarmácia

Substâncias extraídas de animais, plantas e microrganismos têm sido a base para tratar e prevenir doenças desde os primórdios da medicina (KOEHN; CARTER, 2005). Este saber tradicional foi alcançado também como resultado da convivência, interação e aprendizado com diferentes grupos étnicos, experiências realizadas pelo ser humano, busca por produtos que curassem doenças. Essas contribuições culturais tornaram-se fundamentais para os avanços científicos com o descobrimento de substâncias tóxicas e terapêuticas ao longo dos anos (DIAS et al., 2012; VIEGAS et al., 2006).

Dentre as substâncias fornecidas pela natureza, as plantas têm se destacado em virtude da riqueza das funcionalidades terapêuticas e medicinais em inúmeras patologias no decorrer dos tempos (MONTES et al., 2009). No âmbito mundial, estima-se que apenas 10% da biodiversidade foi avaliada quanto ao potencial de atividade biológica, e muitos produtos naturais ainda estão para ser estudados. Isso pode sugerir que ainda há espaço para uma investigação mais aprofundada sobre as fontes naturais a serem usadas para fins terapêuticos (DIAS et al., 2012). Em escala mundial, cerca de 70 mil espécies de plantas são utilizadas com fins medicinais e apenas 15% destas tiveram seus efeitos farmacológicos estudados (SÜNTAR, 2020).

Quando se fala em intervenções clínicas, cerca de 15% delas utilizam os vegetais como forma terapêutica. Estima-se que 200 mil tipos de metabólitos secundários tenham sido registrados, sendo aproximadamente 170 mil estruturas únicas (CECHINEL-ZANCHETT, 2016). Atualmente, calcula-se que aproximadamente 40% de todos os medicamentos comercializados sejam produtos naturais ou derivados semi-sintetéticos de seus metabólitos secundários (LAHLOU, 2013; LAUTIE et al., 2020).

Para ressaltar a importância das plantas medicinais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) observou que pelo menos 80% dos habitantes que vivem em países em desenvolvimento dependem dos produtos naturais, em especial as plantas medicinais, para a cura e prevenção de diversas enfermidades. Além disso, em várias regiões do planeta a opção pela terapia com esses materiais vem aumentando em virtude do efeito equiparado e baixo riscos de efeitos adversos quando comparados às drogas alopáticas (BORGES et al., 2019; FERREIRA; BARATA, 1998; PACHECO et al.,

2021).

São crescentes a fabricação e a comercialização de fitoterápicos em nível nacional. Atualmente, cerca de 25% dos medicamentos comercializados no Brasil são derivados direto ou indiretamente de plantas medicinais (ALMEIDA; FURTADO; BARCELLOS, 2021; BALUNAS; KINGHORN, 2005). Diante desses dados, fica evidenciado que ainda há espaço para pesquisas mais aprofundada sobre as fontes naturais a serem usadas para fins terapêuticos (SÜNTAR, 2020).

O mercado de produtos naturais teve um grande avanço após o surgimento da “onda verde”. Esse processo se deu no final da década de 60 com o movimento *hippie*, os quais procuravam novos estilos de vida que integrasse a natureza no seu cotidiano, vivendo em harmonia com esta e preferindo a utilização de produtos naturais. Nos anos 80 a Europa e EUA incorporam essa tendência e passaram a exigir alimentos livres de contaminantes, pesticidas e outras substâncias tóxicas, produtos terapêuticos derivados de plantas como alternativa aos alopáticos que produzem muitos efeitos colaterais. Vale ainda lembrar que, os adeptos dessa medicina alternativa, na maior parte deles, possuem alto grau de instrução e renda acima da média, mas que preferem o estilo de vida valorizando a natureza do que os produtos industrializados (FERREIRA; BARATA, 1998).

Há muito tempo é reconhecido que as estruturas de produtos naturais têm as características de alta diversidade química, especificidade bioquímica e outras propriedades moleculares que as tornam favoráveis como estruturas principais para a descoberta de drogas e que servem para diferenciá-las de bibliotecas de compostos sintéticos e combinatórios (KOEHN; CARTER, 2005).

Na antiguidade, os químicos estudavam plantas consagradas pelo uso popular, geralmente incorporadas às farmacopeias da época, limitando-se ao isolamento e à determinação estrutural de substâncias ativas. Levando em consideração a importância dos vegetais, a medicina passou a contar com as análises da Química, o que permitiu um rápido desenvolvimento de campos específicos das duas áreas. Desta forma, aconteceu a descoberta de novas moléculas ativas e que foram introduzidas na terapêutica, permanecendo até hoje como medicamentos. Exemplos já foram descritos, como os alcaloides de *Cinchona* e de *Papaver* (VIEGAS; DA SILVA BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Diante dessas perspectivas, um país que apresenta magnitude devido a vasta

biodiversidade presente é o Brasil que, no conjunto de todos os seres vivos, não se tem estimativa do quantitativo de espécies e sua variabilidade genética. No entanto presume-se que os brasileiros detenham cerca de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e micro-organismos na sua heterogeneidade biológica, que os tornam o país o primeiro colocado em diversidade (BRASIL, 2012).

Em 1994, o mercado nacional de medicamentos vendidos por drogarias somou o valor de US\$ 3,83 bilhões. Dessa quantia, 5,5% (US\$ 212 milhões) correspondia as plantas medicinais. Já na atualidade, o mercado nacional fatura US\$ 400 milhões por ano com fitoterápicos. À nível mundial, as cifras financeiras que movimentam o mercado gira em torno de US\$ 22 bilhões de dólares por ano (ALVES NETO; VALADARES; COSTA, 2020). No ano de 2011, o faturamento com produtos fitoterápicos no mercado nacional foi de R\$1,1 bilhão, com 43 milhões de vendas, um aumento de 13% em relação ao ano anterior (LIMA et al., 2022). Esse mercado se mostra promissor no Brasil, visto que no ano de 2015 o faturamento registrado foi de aproximadamente US\$ 554,5 milhões com fitoterápicos, um aumento considerável de 6% quando comparado ao ano de 2014 (US\$ 523,11 milhões) (CARVALHO et al., 2018).

O interesse por produtos vegetais com atividades terapêuticas em relação ao consumo de produtos industrializados é uma prática em ascendência. Os laboratórios de pesquisa espalhados pelo mundo estão preocupados com estudos, triagem e teste de diversos extratos contra diversas patologias a fim de usufruir da extensa diversidade química que a natureza nos proporciona e aprimorá-las (LAUTIÉ et al., 2020).

Ao longo do tempo, o uso de produtos naturais aumentou devido a sua eficiência, baixa toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo, no entanto, mais estudos são necessários para provar cientificamente a eficácia desses produtos (TOBOUTI et al., 2017).

2.2. Plantas Medicinais

A prática do uso de plantas medicinais como forma de tratamento é um método ancestral da prática terapêutica, atividade adotada para profilaxia, tratamento e cura de enfermidades (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). A interação dos índios, negros e jesuítas cooperou para a propagação desse conhecimento e popularidade em todo território brasileiro (FERREIRA; BARATA, 1998). Com essa tradição hereditária, os brasileiros sempre fizeram uso destes recursos naturais para tratamentos de diversas doenças agudas e crônicas passando a chamar a atenção da comunidade científica e posteriormente de empresas farmacêuticas para o estudo desses vegetais nativos do Brasil e das suas respectivas moléculas bioativas (DUTRA et al., 2016).

As plantas medicinais chamaram a atenção da coroa portuguesa e eram descritas em comunicações de naturalistas com a corte. Nas cartas enviadas ao rei haviam citações dos vegetais e de sua aplicação medicinal. O naturalista de maior destaque que esteve em terras brasileiras no século XVI foi Gabriel Soares de Sousa que redigiu em 1687 o “Tratado Descritivo do Brasil” com riqueza de detalhes sendo publicado somente no ano de 1825 (ALVES, 2013).

A importância das plantas medicinais vai além dos continentes e grupos sociais. Ainda em meados do século XVIII, ao escrever uma carta ao presidente da Royal Society, o Reverendo Edmund Stone relatou o caso de sucesso da casca do salgueiro (*Salix alba*) para cura de sezão (malária). A referida propriedade biológica deste vegetal foi descoberta pelo raciocínio do pesquisador que observou que o salgueiro se desenvolve em área pantanosas e úmidas, regiões estas também comum ao *Plasmodium*. Diante desse fato, o autor pensou que a planta possuiria ação farmacológica para a malária (sezão) (CARVALHO, 2004).

Em 1893, no Brasil, o farmacêutico Theodor Peckolt resolveu publicar seus estudos que fizera com as plantas medicinais brasileiras por meio do livro “História das Plantas Medicinais e Úteis no Brasil”, que continha a descrição botânica, técnicas de cultivo, partes utilizadas no tratamento, composição química, indicações terapêuticas, dosagens e usos industriais. Tal fato veio tornar um marco no tema de ação medicinal das plantas brasileiras e ainda é referenciado até os dias atuais, visto que contempla as únicas publicações sistematizadas do gênero (FERNANDES, 2003; PECKOLT; PECKOLT, 2016; SANTOS; PINTO; ALENCASTRO, 1998).

De forma equivocada as plantas medicinais são intituladas de produtos saudáveis, seguro e benéfico. No entanto, elas possuem metabólitos ativos que são sintetizados através de uma ação bioquímica e que produzem ação tóxica contra os agentes agressores, caracterizando-o como um sistema imunológico próprio de defesa do vegetal (FERNANDES, 2003; SANTOS et al., 1998).

Muitas espécies acumulam moléculas com elevado grau de toxicidade, como ocorre com a mandioca que concentra alta quantidade de glicosídeos cianogênicos, excesso de proteínas na ricina, entre outros metabolitos secundários. Tomando como base essa premissa, os cuidados com a administração das plantas com fins terapêuticos têm que ser avaliados criteriosamente e se torna cada vez mais necessário o aprofundamento nos estudos sobre esta temática, visto que as estatísticas estão apontando uma ascendência na escolha dessa categoria de medicamentos frente aos alopáticos no mercado brasileiro (MENGUE; MENTZ; SCHENKEL, 2001).

Como um país localizado próximo aos trópicos e o favorecimento pelo clima tropical úmido, o Brasil possui a maior biodiversidade genética mundial com estimativa entre 350 e 550 mil espécies de vegetais. Deste quantitativo, apenas 55 mil espécies são catalogadas em herbários, e muito poucas já foram pesquisadas, inclusive aquelas com propriedades médicas. Com toda essa diversidade biológica, os brasileiros ainda importam quase 100% da matéria prima para produção de fitoterápicos (BRASIL, 2012b; CARNEIRO et al., 2014; E. E. FERREIRA et al., 2022; S. H. FERREIRA & BARATA, 1998; L. P. B. ROCHA et al., 2021).

Anualmente, o índice de informações sobre plantas medicinais vem crescendo cerca de 8% nas duas últimas décadas (OLIVEIRA; LEHN, 2015). Vale a pena considerar que a nação brasileira representa o décimo mercado farmacêutico mundial e 82% de sua população ainda faz uso de produtos à base de plantas medicinais, seja ela originária da cultura indígena, quilombola ou outras etnias (BRASIL, 2012b). Essa preferência do brasileiro pelos fitoterápicos é justificada pelos usuários ao alto custo e alta toxicidade dos alopáticos, baixo custo das plantas medicinais, ao difícil acesso aos serviços de saúde por comunidades, evolução e comprovação científica da ação farmacológica das drogas naturais, ascendência evolutiva nos controles de qualidades da matéria prima e desenvolvimento de novas formas de administração. Hoje, tal prática é regulamentada pelos sistemas públicos de saúde e implementada nas

unidades básicas de saúde do país (ROCHA et al., 2021a; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

Em 2006, o Ministério da Saúde do Brasil (MS) legitimou a prática da fitoterapia com a instituição da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS (PNPIC) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), assim regulamentando a implementação no Sistema Único de Saúde da aplicação terapêutica das plantas medicinais. Tais políticas foram homologadas com um dos princípios voltados ao incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais, valorizando a flora do Brasil, a socialização de informações sobre as plantas medicinais e medicamento fitoterápicos, com as respectivas alterações conforme o ouvinte, sempre dando enfoque ao usuário (ALVES NETO; VALADARES; COSTA, 2020).

A PNPIC trata da inserção de várias formas terapêuticas como a Fitoterapia, a Homeopatia, a Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura, o Termalismo/Crenoterapia e a Medicina Antroposófica, as quais deveriam ser complementares ao tratamento nos pacientes do SUS. Já a PNPMF, diz respeito somente a uma das atividades do PNPIC, que é a fitoterapia e diz respeito às diretrizes mais amplas, formas de monitoramento e avaliação e responsabilidades institucionais. Tais publicações se propõem garantir a prevenção de agravos, a promoção e a recuperação da saúde com ênfase na atenção básica à saúde e visa contribuir para o aumento da resolubilidade do sistema com qualidade, eficácia, eficiência, segurança, sustentabilidade, controle e participação social (FIGUEREDO et al., 2014).

Em 11 de Dezembro de 2008, com a publicação da Instrução Normativa nº 05, a ANVISA divulgou a Lista de Medicamentos Fitoterápicos de Registro Simplificado, contemplando vegetais que tinham seus estudos de segurança e eficácia bem estabelecidos, como a Castanha da Índia (*Aesculus hippocastanum* L.), alho (*Allium sativum* L.), babosa (*Aloe vera* (L.) Burm f.), arnica (*Arnica montana* L.), alcachofra (*Cynara scolymus* L.), ginkgo (*Ginkgo biloba* L.), Guaco (*Mikania glomerata* Sprengl.), Ginseng (*Panax ginseng* C. A. Mey.), maracujá (*Passiflora incarnata* L.), entre outras. Vale ressaltar que desta lista apenas o guaco e o maracujá são produtos oriundos da flora brasileira (ANVISA, 2008).

Em 2009, por intermédio do Ministério da Saúde, foi elaborado a Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), que apresenta 71 espécies de

plantas medicinais com propriedades terapêuticas. Tal norma visa orientar a cadeia produtiva, estimular o desenvolvimento de pesquisas científicas com plantas medicinais, a geração de produtos de interesse ao Sistema Único de Saúde Brasileiro (SUS) e desta forma incentivar o fomento em pesquisas na área (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

No ano de 2011, em virtude das atividades relacionadas a prescrição e dispensação de plantas medicinais, a ANVISA lançou a primeira edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira e incentivou a criação da denominação “Produto Tradicional Fitoterápico” que veio a flexibilizar ainda mais a política de registro de drogas vegetais e reconhecer como oficinais ou farmacopeicos. Com essa determinação, fica permitido sistema de notificação desses medicamentos e ainda autorizados a serem manipulados e estocados com demanda mínima nas prateleiras das farmácias de manipulação ou farmácias vivas (BRASIL, 2021).

Já em 2016, atendendo a RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 84, DE 17 DE JUNHO DE 2016, foi aprovado o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. Essa normativa foi assinada visando contribuir com a fitoterapia racional, auxiliando os profissionais prescritores com o fornecimento de um conteúdo baseado em pesquisas científicas e que dispõe da descrição de 28 drogas vegetais bastante difundidas popularmente pelo país e que nos dão segurança no uso clínico (ANVISA, 2016).

No cotidiano brasileiro, várias são as espécies adotadas como terapêuticas e o cultivo doméstico é a principal forma de aquisição destes produtos. Isso acontece sobretudo em cidades menores, em populações de baixa renda e baixo grau de escolaridade. No entanto, ainda existe certas resistências pelos prescritores quanto a indicação desses produtos. Essa barreira deve-se às incertezas na procedência do produto, presença de contaminantes e materiais estranhos as espécies, troca de espécies por outra, adulteração de amostra, procedimento inadequado na coleta, ausência de padronização dos materiais, entre outras (PERNA; LAMANO-FERREIRA, 2014).

No âmbito nacional, livros descrevem os vegetais que possuem atividade farmacológica e que estão presentes em território brasileiro. Uma obra a ser citada e que é referenciada até a contemporaneidade é a “História das Plantas Medicinais e Úteis do Brasil” que é disposta em 8 fascículos que descrevem sobre 315 espécies de

plantas medicinais e foi publicado entre os anos de 1888 e 1914 de Theodoro Peckolt, farmacêutico e botanicista. Peckolt foi um dos mais importantes pesquisadores presentes em solo brasileiro que chegou a analisar mais de 6 mil ervas medicinais brasileiras e publicou acima de 400 artigos científicos. A ele é atribuído o recorde brasileiro de quem mais analisou quimicamente as plantas da flora brasileira do século XIX, e pode ser que essa marca permaneça até os dias de hoje (PARAENSE; SANTOS, 2005; PECKOLT; PECKOLT, 2016; SANTOS; PINTO; ALENCASTRO, 1998).

Além de pesquisador, Peckolt ainda foi proprietário de farmácias e possuía um laboratório próprio no seu estabelecimento para realizar as análises das plantas brasileiras. Em sua enciclopédia História das Plantas Medicinais e Úteis do Brasil, o autor apresenta cada espécie de plantas medicinais a classificação botânica e técnicas de cultivo, partes anatômicas que são utilizadas, composição química de forma sintética, aplicações terapêuticas em diversas moléstias, doses, usos industriais de plantas brasileiras, entre outras informações de inúmeras espécies encontradas em solo brasileiro. O atributo de sua referência se deve ao fato desse compêndio ser uma das únicas publicações sistematizadas do gênero e ser muito rico em informações devido a quantidade de plantas medicinais descritas na obra. No entanto, ele apresentou análises químicas de apenas cerca de 285 plantas e, na maioria dos casos, ele analisava folhas, flores e cascas separadamente, e cada análise publicada correspondia a uma média de três ensaios realizados (PARAENSE; SANTOS, 2005; PECKOLT; PECKOLT, 2016; SANTOS; PINTO; ALENCASTRO, 1998).

Uma coletânea de aproximadamente 1450 plantas medicinais foi citada por Mors & Rizzini (1966) em uma obra que relaciona aspectos botânicos, farmacológico e químicos das plantas medicinais. Mais tarde, Lorenzi & Matos (2008) publicaram obra equivalente que popularizou o conhecimento contido quase sempre em *papers* e livros em inglês de difícil acesso.

Outro livro que possui grande mérito até os dias atuais devido sua descrição das plantas terapêuticas é o “Diccionario das plantas úteis ao Brasil e das exóticas cultivadas por M. Pio Corrêa”, que se trata de um compêndio botânico que foi publicado no ano 1926 e que apresenta inúmeras plantas medicinais organizadas por ordem alfabética do nome vulgar dos vegetais de ocorrência em todo o território brasileiro. Outros volumes da obra foram publicados nos anos 1931, 1952, 1969,

1974, 1975 e em 1984 as obras foram reeditadas pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Federal - IBDF em conjunto com o Ministério da Agricultura. Quanto aos itens citados na bibliografia, estes são aplicados até os dias atuais como medicamentos de uso tópicos e até orais (BIAVATTI et al., 2007; CORREA, 1931).

Carvalho (2004) produziu uma obra com 23 fitoterápicos populares no Brasil e que são voltados a aplicação na inflamação, com os dados científicos pré-clínicos e clínicos, as orientações de como prescrevê-las e seus atributos farmacológicos. Entre os vegetais citados, estavam a andiroba (*Carapa guianensis*), alho (*Allium sativum*), copaíba (*Copaifera spp.*) Camomila (*Matricaria recutia*), gengibre (*Zingiber officinale*), pau-ferro ou jucá (*Libidibia ferrea*), entre outras.

Uma região que vem se destacar é a Amazônia por ter em sua grande extensão territorial uma rica biodiversidade em plantas com enormes potenciais terapêuticos. Sua extensão territorial chega a medir cerca de 5 milhões de km², com 14.003 espécies de plantas superiores catalogadas, e muitas delas são consideradas aromáticas e/ou terapêuticas (CARDOSO et al., 2017; FERREIRA; BARATA, 1998).

Muitos desses vegetais estão contidos até na RENISUS, Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira e o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. Vale lembrar que nessa região, a prática dessa terapia como remédio é comum e, às vezes, esse corresponde ao único recurso medicinal em algumas comunidades. No entanto, essas práticas vêm sofrendo interferência direta da medicina ocidental moderna, e também da falta de interesse da população jovem em relação aos usos desses saberes, o que se torna ameaçador a cultura hereditária da transmissibilidade do conhecimento sobre plantas medicinais (RENISUS, 2022; D. L. SANTOS et al., 2019).

Carl Friedrich Phillip von Martius, foi um naturalista católico nascido na região de Munique na Alemanha que viajou pelo Brasil durante 1817 e 1820 para realizar investigações Botânicas e Antropológicas. Nesse percurso, passou por Santarém (PA), Manaus (AM) e fronteiras da Colômbia e da Venezuela e chegou a coletar cerca de 6.500 espécies de plantas. Nessa passagem chegou a relatar sobre inúmeras plantas medicinais que estão contidas em suas obras bibliográficas “Flora brasiliensis”, “Systema de Materia Medica Vegetabilis Brasiliensis”, “Das Naturell, die Krankheiten, das Arztthum und die Heilmittel der Urbewohner Brasiliens” (A natureza, as doenças, a medicina e os remédios dos nativos do Brasil). Nessas obras, citou a

sucuuba (tratamento de úlceras), seringueira (antiparasitário), assacu (antihelmíntico), Mandioca (antídoto e limpeza do sistema linfático), Sucupira (dor reumática e tumores artríticos), copaíba (gonorreia), cumaru (Nervoso, analéptico restaurador, cardíaco, diaforético e emenagogo), andiroba (Exantema, principalmente aquele originado de picadas de insetos da família Simuliidae, dermatofitose, anti-helmíntico), Ucuúba (Cólica, dispepsia, dor reumática, tumores artríticos), jamborandi (Diaforético, diurético, sialogogo, expectorante, antídoto), entre outras (BREITBACH et al., 2013).

No trabalho realizado por Luiz et al., (2014), no qual buscavam avaliar a preferência comunitária no município de Igarapé-Miri (Estado do Pará) em escolha por grupos de drogas, seja ela alopáticas ou plantas medicinais, nos anos de 2000 e 2008. Assim, observaram que a preferência por remédios caseiros ainda prevalecia em alta, com média de 62,5% frente aos pacientes que escolhem medicamentos alopáticos (17,5%) e os que optam por intercalar as duas categorias de medicamentos (20%). Como argumentos para escolha de tal tratamento citavam que a “planta medicinal não contém química”, que o produto não possui contraindicação”, o produto “não faz mal”, “questão de tradição de família”, da posse de baixo recurso financeiro para compra de medicamentos alopáticos e ainda pela escassez de fornecimento dos medicamentos ditos essenciais.

Desta forma, algumas obras retratam o uso dessas plantas que habitam nesta imensa extensão territorial, que é o Brasil, e que vira foco mundial quando o tema discutido se refere a biodiversidade. Rios & Pastore Júnior (2011) elaboram uma obra muito relevante que trata de informações de 450 espécies de vegetais muito conhecidos em toda comunidade amazônica e que possuem aplicabilidade medicinais e até industriais. Dentre as unidades de plantas citadas tem quatro espécies de Copaíferas, pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), macaca poranga (*Aniba parviflora*), jucá (*Caesalpineia ferrea*), espécies do cróton, de piperácea, maracujá (*Passiflora spp*), dentre outras.

Em uma revisão sistemática sobre as famílias de plantas medicinais mais utilizadas na região amazônica, Páscoa Júnior & Souza (2021) relataram que as Fabaceae são as mais frequentes e possuem espécies que a população indica eficiência terapêutica no tratamento de alterações gastrointestinais (diarreia e dor abdominal), antimicrobiano, antiinflamatórios, desordens hepáticas e até câncer, como por exemplo a copaíba (*Capaifera paupera*). As famílias Euphorbiaceae e

Rubiaceae são apontadas pela população como úteis para o alívio de alterações hepáticas, vesiculares, estomacais e renais, além de reduzir a dor e a febre. São representantes da família Euphorbiaceae, o assacu (*Hura crepitans*) e quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*). A família Rubiaceae estava representada na pesquisa pelo jenipapo (*Genipa americana*) e a unha-de-gato (*Uncaria guianensis*).

Vale ressaltar a importância da inserção feminina na prática da fitoterapia. Para Páscoa Júnior & Souza (2021), as mulheres são as maiores responsáveis pelo conhecimento do uso de plantas medicinais e isso faz com que recaia sobre si o cuidado a ser tomado com os entes queridos quando se fala em saúde familiar. Elas além de dominarem essa atividade, ainda cuidam de seus respectivos quintais onde cultivam em canteiros ou no solo, seus remédios caseiros.

Mesmo diante de inúmeros estudos envolvendo as plantas medicinais, a fitoterapia e ação farmacológica, ainda são escassos os trabalhos que comprovem as ações terapêuticas dos vegetais existentes no Brasil, em especial a Amazônia. Mais incentivos se tornam necessários para a confirmação das formas farmacêuticas, doses, tempo de estabilidade e de armazenamento, forma de preparo, possíveis interações medicamentosas e efeitos toxicológicos no que remete a esses produtos (PÁSCOA JÚNIOR & SOUZA, 2021).

2.2.1. *Carapa* sp (Andiroba)

2.2.1.1. O gênero *Carapa*

A grande diversidade da floresta amazônica abriga a maior e mais rica cobertura vegetal do planeta, contendo cerca de 14.003 diferentes espécies (D. Cardoso et al., 2017). Várias dessas espécies são produtoras de sementes oleaginosas de onde são extraídos óleos vegetais de grande potencial físico-químico, apresentando capacidade nutricional, econômica e tecnológica, gerando interesse para muitas pesquisas (SARQUIS et al., 2020; SILVA, 2018).

Como uma das famílias botânicas que possuem espécies e apresentam estas características se tem a família *Meliaceae*. Essa família possui cerca de 51 gêneros e 550 espécies e é de origem nativa e endêmica no Brasil (BRASIL, 2021). Possui distribuição global, sendo encontrada na América Central até ao norte da América do Sul, na Nova Zelândia, Ásia, costa oriental da Austrália e na África Central (KENFACK, 2011).

No Brasil, esta família é constituída por 7 gêneros sendo eles *Cabralea*, *Guarea*, *Carapa*, *Trichilia*, *Swietenia*, *Khaya* e *Cedrela*. Na região amazônica somente duas espécies de andiroba são utilizadas pelos povos tradicionais, a *Carapa guianensis* e *Carapa procera*. Ambas podem ser encontradas nos estados como Pará, Acre, Amazonas, Amapá e Maranhão, conforme Figura 1. Seu habitat está relacionado em florestas temporariamente alagadas, várzeas, matas ciliares, podendo ocorrer também em terra firme, ao longo dos rios, córregos, manguezais, normalmente em pequenas populações agrupadas por toda bacia amazônica (BRASIL, 2021; Costa & Martins, 2017; Maia et al., 2022).

Figura 1 - Distribuição geográfica da *Carapa guianensis* Aubl. no Brasil.



Fonte: Brasil (2021).

As espécies do gênero *Carapa* são conhecidas popularmente como andiroba, andirobinha, andiroba branca, andiroba-do-igapó, entre outras. A etiologia do nome “andiroba” deve-se a origem tupi-guarani que possui o significado de gosto amargo (DENISE et al., 2021; FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; MACHADO; MENDES, 2021).

A andirobeira, como é conhecida a árvore da andiroba, é considerada de médio a grande porte e está distribuída ao longo da costa atlântica da América Central, na América do Sul da Colômbia ao Brasil, Equador e na Amazônia Peru. Na sua árvore há grande interesse comercial. Das sementes são extraídos o óleo que é uma das drogas naturais mais vendidas na Amazônia e possui demanda até internacional, chegando a ser exportada para países como Estados Unidos e os europeus. No aspecto extrativismo, não há grandes áreas para extração de óleo e essa atividade é

executada por pequenos grupos familiares (extrativistas) que colhem os frutos na região e extraem o óleo ou vendem as amêndoas *in natura* para empresas que esmagam nas e produzem o óleo (COSTA; MARTINS, 2017; MACHADO; MENDES, 2021).

Este vegetal, que também é bastante cobiçado, representa um grande apelo socioambiental, visto que é mais viável vê a árvore em pé e produzindo, do que cortada e utilizada em outras finalidades como na indústria madeireira. Das suas folhas secas prepara-se um chá benéfico para tratamento de doenças renais, bexiga e é considerada antiinflamatória e cicatrizante. Praticamente tudo da Andiroba é aproveitada, a massa que sobra da extração do óleo serve para fazer sabão, vela e sabonete (MACHADO; MENDES, 2021; RIBEIRO et al., 2021). A casca da árvore é usada como cicatrizante e vermífugo. A sua madeira possui alta qualidade e valor comercial visto que é aplicado na fabricação de móveis, construção civil, lâminas e compensados que eram aplicados na confecção de tampos de mesas, cadeira e assentos. A matéria da madeira apresenta cerne vermelho escuro, um lustre e brilho natural atraente, textura grossa, cheiro e gosto indistintos, aceita boa trabalhabilidade pois recebe bem a entrada de pregos e tem uma superfície lisa e regular possuindo similaridade com o mogno (*Swietenia macrophylla*), a qual junto com o cedro, fazem parte da mesma família botânica, a Meliaceae (COSTA; MARTINS, 2017; RIBEIRO et al., 2021).

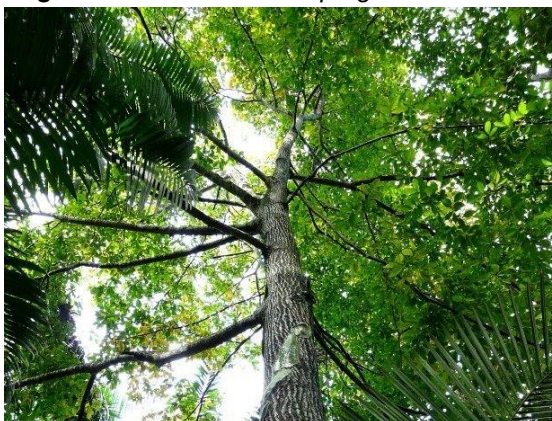
Os relatos de uso do azeite de andiroba constam na publicação do Diálogos das grandezas do Brasil, de Brandão (2010). Nesta obra, o autor apresenta manuscritos de 1618 que referenciam a importância da oleaginosa, ao qual chamavam a árvore de “*jnhanduroba*”. Outra descrição história da andiroba foi realizada por Jean-Baptiste Christopher Fuseé Aubiet (1720-1778), na Guiana, no ano de 1775. Após esse feito, o seu se espalhou amplamente pela Guatemala, Peru, Colômbia, Panamá, Venezuela, chegando ao Brasil. No Brasil, o desenvolvimento foi tal que se estabeleceu a primeira indústria do óleo de andiroba, especificamente na cidade de Cametá, no estado do Pará (MACHADO; MENDES, 2021).

2.2.1.2. Características botânicas da *Carapa guianensis*

A andirobeira é do tipo perenifólia, podendo atingir até 55 metros de altura, porém, facilmente são encontrados espécimes com 25-35 metros. Está presente nas

áreas mais úmidas da floresta de terra firme e possui um tronco cilíndrico e reto que às vezes pode apresentar raízes que se desenvolvem junto com os troncos da andirobeira, formando em volta dele divisões achatadas que são conhecidas como sapopema. Sua copa tem tamanho mediano, densa e constituída de ramos erguidos com leve curvatura pelo qual pode ofertar uma sombra intensa (Figura 2). Tem uma casca espessa muito amarga, com coloração acinzentada ou avermelhada que se desprende da planta em grandes pedaços facilmente (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; NASCIMENTO et al., 2019).

Figura 2 - Árvore de *Carapa guianensis* Aubl.



Fonte: BRASIL (2021).

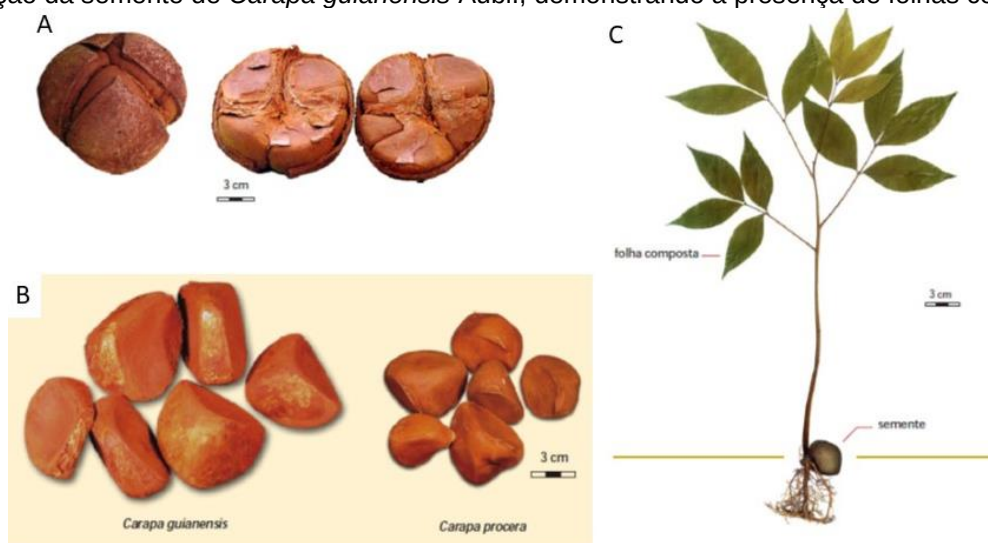
Suas folhas apresentam em média de 80 a 110 cm de comprimento, são do tipo alterpinadas, com vestígio de um folíolo terminal, tomentoso e glandular. Possui folíolos oposto de 3 a 10 pares que medem em torno de 10 a 50 cm de comprimento e 4 à 18cm de largura, com margens inteiras e apresentam coloração verde-escuro brilhante na superfície superior e glabra na superfície inferior com pelos simples e esparsos na nervura central. A *C. guianensis* apresenta nectários extra-floral na pontas das folhas, atraindo principalmente formigas (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Esta espécie é monóica, havendo inflorescência feminina e masculina em suas flores bege ou brancas que apresentam um toque levemente perfumado, com pétalas que medem 8 mm de comprimento. As flores da *C. guianensis* são predominantemente 4 meras (com 4 sépalas, 8 pétalas e 16 estames). Ela tem a panícula grande que chega a medir entre 20 e 90 cm de comprimento que são

sustentadas por brácteas pontudas, axilar ou sub-terminal (COSTA; MARTINS, 2017; HIURA et al., 2008; SARQUIS et al., 2020).

Seu fruto se apresenta como uma cápsula esférica (ouriço arredondado), seca e indeiscente, possuindo quatro valvas de 3 a 5 cm de diâmetro contendo geralmente entre 4 e 12 sementes marrons, de laterais anguliformes ocasionada pela compressão com as sementes vizinhas. Quando cai da árvore, são liberadas as sementes ricas em óleo amarelo-claro extremamente amargo. Estas, por si só, podem apresentar variação no seu tamanho (Figura 3A) (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; HIURA et al., 2008; NASCIMENTO et al., 2019). As sementes da *C. guianensis* se distinguem da *C. procera* por a primeira apresentar um hilo maior sem saliência delimitante, apresentando resíduos de tecidos da placentação (Figura 3B) aderidos (COSTA; MARTINS, 2017).

Figura 3 - (A) Fruto, (B) Sementes das espécies *Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* D.C. e (C) germinação da semente de *Carapa guianensis* Aubl., demonstrando a presença de folhas compostas.



Fonte: Adaptado de BRASIL (2021).

A árvore da *Carapa guianensis* se desenvolve tanto em florestas primárias quanto em secundárias e possui diversos habitats, inclusive em toda a bacia amazônica, desde áreas de várzea, margem de igarapés e rios, até floresta de terra firme. Sua grande adaptação em vários ambientes se dá devido a sua estratégia de dispersão por meio de roedores, mamíferos e outras espécies de animais que escolhem essas sementes como alimentos por serem uma fonte rica de minerais e proteínas, bem como pela dispersão por cursos d'água onde suas sementes flutuam

e são constantemente espalhadas por grandes distancias (JESUS-BARROS et al., 2015; RIBEIRO et al., 2021).

2.2.1.3. O óleo de andiroba (*Carapa guianensis*)

O óleo da andiroba é um produto típico da região amazônica que chegou ao reconhecimento mundial. Apesar de alguns de seus subprodutos possuírem alto valor agregado e serem fabricados por todo o Brasil, geralmente o seu beneficiamento acontece em áreas descentralizadas do foco de onde é extraído o azeite, como em comunidades da Amazônia (GILBERT, 2006).

Na fitoterapia tradicional da Amazônia para o tratamento de doenças da pele o óleo bruto de andiroba (*C. guianensis*) é recomendado devido às propriedades antimicrobianas e antiinflamatórias. Ele é aplicado terapêutica e profilaticamente misturado com mel e copaíba no combate a inúmeras enfermidades (COSTA; MARTINS, 2017). Além de ser extremamente amargo, ainda é usado como combustível na iluminação, no preparo de sabonetes, cremes, óleos corporais, batons, outros cosméticos e até fitoterápicos no Brasil e na Guiana (MACHADO; MENDES, 2021; RIBEIRO et al., 2021).

Dentre os usos como produtos terapêuticos, os extrativistas, índios e ribeirinhos o aplicam para diversos fins, como: febre, dor, picadas de cobra, escorpiões e abelhas, no combate a vermes e protozoários, artrite, tétano, reumatismo, infecção renal, hepatite, icterícia e outras infecções hepáticas, dispepsia, fadiga muscular, dores nos pés, resfriados, gripes, tosse, psoríase, sarna, micose, hanseníase, malária, tétano, herpes e úlceras graves, caxumba, repelente, bem como para tratar infecções do trato respiratório superior, dermatites, abrasões (COSTA; MARTINS, 2017; MACHADO; MENDES, 2021).

Segundo Ribeiro et al. (2021), o óleo da Andiroba apresenta uma composição rica em ácidos graxos, especialmente o ácido mirístico (ácido tetradecanóico), palmítico (ácido hexadecanóico), ômega 6, ômega 9, vitaminas e minerais.

A extração do óleo em si, dá-se em caráter artesanal ou industrial e pode levar de 30 a 90 dias todo o protocolo, dependendo do mecanismo extrativo. No entanto, num estudo comparando as técnicas, pesquisadores já encontraram substâncias ativas no óleo que foi submetido ao processo tradicional de extração e que não apareceu no óleo extraído por outros métodos. A forma rudimentar de extrair o óleo é

dividida em quatro etapas consecutivas: coleta das sementes; cozimento e repouso das sementes; preparação de descasque e preparo da massa; e coleta de óleo. O repouso das sementes e a coleta do óleo são as etapas mais demoradas (NARDI et al., 2016).

Geralmente, uma andirobeira tem capacidade produtiva de 50 quilogramas anual de sementes podendo chegar até o montante de 120 quilos. Já um extrativista com boa proticidade é capaz de juntar entre 200 e 300 kg diariamente (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; MAIA; SOARES; PEREIRA, 2022; NARDI et al., 2016).

Para a coleta das sementes da andiroba, o período adequado é entre os meses de março e julho, sendo que no mês junino é a coleta com maior rendimento e qualidade. Nessa etapa ocorre uma triagem que retira as sementes podres, muito moles ou roídas por animais. Recomendado o recolhimento logo após o processo dispersivo embalando-as em sacos plástico de transporte por um curto período a fim de evitar a desidratação das amêndoas que não são tolerantes ao dessecamento. As valvas devem ser abertas com impacto físico e retirando-as manualmente. Quando necessário, as sementes são imersas em água por pelo menos 24 h para matar afogada as larvas da *Hypsipyla sp.* e logo em seguida cozidas. Esse parasito é capaz de reduzir a qualidade do produto da andiroba (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; NARDI et al., 2016).

O processo tradicional de extração do óleo de andiroba demanda muito tempo. No entanto, é um procedimento rústico pelo qual o conhecimento se passa de pai para filho por meio de conversas e hábitos. Entretanto, com a evolução da modernidade, outros métodos mais eficientes como a prensa fez com que essa técnica ancestral tenha reduzido em algumas áreas, porém vale ressaltar que ainda há pessoas que realizam a extração tradicional, principalmente, em localidades isoladas, sem eletricidade e com escassez de bens e serviços (MENDONÇA; FERRAZ, 2007).

Após coletadas, selecionadas, submersas em água, as sementes são lavadas em água limpa corrente e cozidas em panelas ou latas num fogão a lenha num período de 30 minutos a 2 horas, tempo suficiente para se observar com um toque tátil nas amêndoas o desprendimento do óleo e atestar o prosseguimento à próxima etapa. Logo em seguida, elas são colocadas em descanso por 15 a 30 dias numa área sombreada e ventilada em recipientes como cestos por algumas semanas para que

as paredes celulares das sementes sofram alterações e permita que o óleo seja extraído com mais facilidade (NARDI et al., 2016).

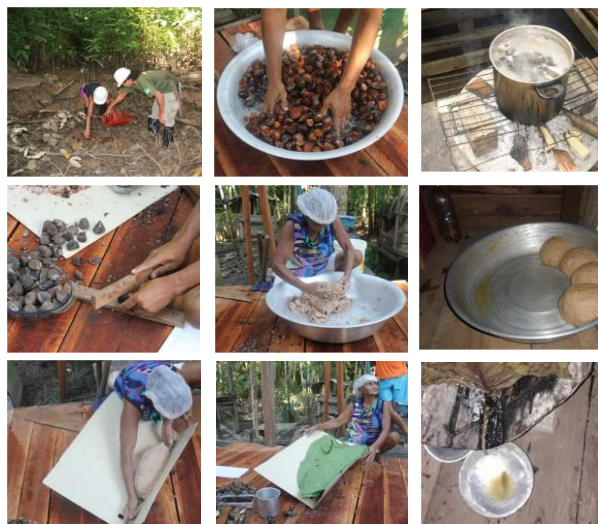
Então as sementes são socadas em um pilão ou quebradas com pedaço de madeira, martelo ou faca. Daí a carne é removida das cascas das sementes, amassadas e formado o “pão de andiroba”, sempre evitando o desperdício de material. Vale evidenciar que para tal atividade existem regras que são bastante divulgadas entre os povos amazônicos que laboram nesse extrativismo e serve para controlar alguns problemas que há de acontecer no procedimento. Dentre essas normas se têm a proibição de mulheres menstruadas não tocar ou mesmo olhar a massa, pois isso pode interromper o fluxo de óleo, pessoas com “olho ruim”, “pessoas ruins” e invejosos não devem observar essas etapas do processo, pessoas que perderam seus entes queridos e grávidas também não podem tocar na massa e nem olhar (NARDI et al., 2016).

Posteriormente, esse pão ou bola é colocado exposto ao sol em uma superfície inclinada, tipo uma biqueira, pelo qual será liberada o óleo aos poucos, em forma de gotejamento, dando origem ao azeite virgem (Figura 4). Esse aglomerado é então amassado quando está muito oleosa e rosada, por 10 a 30 minutos, 2 à 3 vezes ao dia até ficar escura, seca e quebradiça e formada novamente o bloco. Há uma técnica alternativa a esse da massa na biqueira, onde se ferve o pão em água e o óleo que é menos denso irá flutuar e, com auxílio de uma cabaça, será coletado-o. Caso este processo não seja realizado, o pão de andiroba pode ficar duro e vai dificultar a extração do óleo. Com as sobras dessa massa, alguns comunitários fazem sabão ou a queima para expelir mosquitos. O óleo extraído deve ser armazenado em recipientes fechados de vários tipos e tamanhos. Para manter a qualidade do óleo, recomenda-se que o óleo extraído seja armazenado em recipientes de vidro escuros (âmbar) fechados ou em recipientes de plástico escuro que não tenha sido usado anteriormente para armazenar outros materiais (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002; LOPES DE SOUSA et al., 2019; NARDI et al., 2016).

Diversos fatores podem alterar o rendimento do óleo, como a forma extrativa, a pessoa envolvida no processo, a localidade onde se realiza o procedimento, tempo de armazenamento, entre outros. No trabalho realizado por Nardi et al. (2016) é relatado que o rendimento médio para um quantitativo de 18 litros de sementes (11 kg aproximadamente) gira em torno de quase 2 litros. Na extração em larga escala, como

o processo industrial, o rendimento com a execução da prensagem dupla pode chegar até 30% do peso bruto das sementes (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Figura 4 - Coleta das sementes de andiroba, lavagem, fervura, quebra, formação do "pão de andiroba" e extração do óleo.



Fonte: Adaptado de Nardi et al (2016) e Sousa et al (2019).

O óleo puro da andiroba é tratado como especiarias e tem relevância econômica na exportação. Estima-se que na Amazônia aproximadamente 200 mil famílias que vivem do extrativismo de Produtos Florestais não madeireiros (PFNM). O óleo de andiroba, que é um PFNM pois se considera um subproduto originado das andirobeiras, faz parte do cotidiano desses habitantes. No entanto, essa atividade vive uma instabilidade devido a sua produção ser sazonal e a concorrência com a atividade madeireira (SANTOS & GUERRA, 2010).

Para os habitantes da região da Floresta Nacional do Tapajós é possível produzir em média de 1,2 toneladas por ano do óleo de andiroba (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002). Essa produção chega a ser vendida pelos moradores da FLONA por R\$15,00 o litro e, quando realizada a venda na associação comunitária, alcança o valor de R\$ 60,00 (SANTOS; GUERRA, 2010). Em Sousa et al. (2019), foi relatado que o valor do litro do azeite de andiroba nos municípios de Belém, Breves, Gurupá/PA e Santana/AP, no decorrer do mês de setembro de 2018, ciclou no valor entre R\$30,00 e R\$92,00, cifras quase semelhantes ao de Santos & Guerra (2010).

Contudo, de toda essa cadeia de manufatura, o comunitário que realizou todo o processo é o que menos fatura (7%). O praticante do atacado, aquele que comprou direto do extrator, é o que mais ganha, lhe proporcionando um percentual de 55,8% e

o restante ao vendedor final, o referente a 34,45%. Usualmente, esse vendedor final é o varejista que vende o produto até o consumidor final na forma de frascos fracionados ou produtos beneficiados (SANTOS & GUERRA, 2010).

No método de larga escala, o óleo de andiroba é obtido por prensagem a frio das sementes sem adição de solventes orgânicos ou aditivo químico, preservando seus compostos e gerando uma grande torta residual. Nesse processo, as sementes são quebradas e adicionadas a uma estufa com temperatura controlada de 65°C para que as amêndoas alcancem 8% de umidade. Posteriormente, os fragmentos das amêndoas são comprimidos em prensas hidráulicas do tipo “*expeller*” ou “*cage press*” (Figura 5). Com o auxílio dessa máquina, o rendimento raramente excede 30% do peso das sementes com 8% de umidade. Após a prensagem é produzido um resíduo onde muitos metabólitos são perdidos devido permanecerem presos à parede celular da semente substâncias como: polissacarídeos, compostos fenólicos, proteínas e lipídios (FERRAZ; CAMARGO; SAMPAIO, 2002).

Figura 5 - Imagem ilustrativa de uma máquina extratora de óleo de andiroba “*expeller*”.



Fonte: www.Indiamart.com

2.2.1.4. Composição química da *Carapa guianensis*

O óleo de andiroba é um líquido viscoso com coloração amarelo-marrom característica e pode tornar-se turvo em baixas temperaturas. Apresenta diversos grupos de moléculas lipídicas, principalmente componentes saponificáveis, ácidos graxos (maioria), e uma fração insaponificável composta por triterpenos e principalmente por tetranotriterpenos ou limonóides, substâncias amargas, além de taninos e alcalóides (IHA et al., 2014; REIS; SANTOS; GONÇALVES, 2021; WANZELER et al., 2018).

Ao caracterizarem o perfil químico de amostras do óleo bruto de sementes de *C. guianensis*, Reis et al. (2021) relataram que o óleo apresenta três classes principais de metabólitos: ácidos graxos, triterpenóides e esteróides; em paralelo, também foram observados glicerol, esqualeno e substâncias não identificadas. Melo et al., (2018) mostraram que o perfil de suas amostras foi composto de ácidos graxos (oleico, palmítico, linoleico, esteárico, palmitoleico, mirístico e láurico), monoglicerídeos (monopalmitina e monooleína), esteróides e triterpenóides (alpha-sitosterol, trihidroxicolano 3,7,12-etil-24-oato, desoxi-cericea-lactona, gedunine, 7-oxogedunina, efusanina A e desacetil-gedunina).

Em um trabalho realizado por Peron, Eberlin, Barata (2017) no Instituto de Química da UNICAMP, foi estudado o resíduo industrial da torta da andiroba, ou seja, o que sobra da extração industrial. Logo, verificaram que é neste subproduto que se concentram os Limonóides, as substâncias amargas e que possuem as propriedades terapêuticas do óleo. Usaram para isto técnicas cromatografia líquida acoplada a um espectrômetro de massas (UPLC-MS) determinaram 7 Limonóides no resíduo.

A composição de limonóides do óleo varia entre literatura, entretanto o 7-Deacetoxi-7-hidroxigedunina, gedunina, 6 α -acetoxigedunina, 17-Glicolildesoxigedunina; 7-Desacetil-7-oxogedunina são comuns nos resultados de estudos (AMBROZIN ET AL., 2006; R. N. CARDOSO ET AL., 2006; MIRANDA JÚNIOR, 2010; MIRANDA JÚNIOR ET AL., 2012; NINOMIYA ET AL., 2016).

As condições de armazenamento de sementes, secagem, métodos de extração de óleo, podem influenciar na qualidade do óleo e na proporção dos compostos, o que ocasiona variabilidade entre os resultados (MENDONÇA et al., 2020; NASCIMENTO et al., 2019). No estudo realizado por Nascimento et al. (2019) caracterizaram o perfil lipídico de amostras de óleos de sementes de *C. guianensis* da região de Manaus, AM, Brasil. Estes verificaram a presença de 21 compostos lipídicos, sendo o oleato de metila (42,3%), palmitato de metila (26,0%) e ácido oleico (12,5%) os compostos majoritários, considerando a abundância relativa dos compostos.

Os estudos de Milhomem-Paixão et al. (2017) e Silva et al. (2018) apontaram que mais de 97% dos ácidos graxos das amostras de óleo de *C. guianensis* foram representados pelos ácidos oleico, palmítico, linoleico, araquidônico e esteárico. Iha et al. (2014) avaliaram a composição dos ácidos graxos da *C. guianensis* e identificaram os ácidos: oleico (57,8%), palmítico (25,3%), linoleico (5,9%), esteárico

(10,5%) e mirístico (0,5%), sendo observado 36,3% de ácidos graxos saturados e 63,7% de insaturados. Ainda segundo os autores, essa variabilidade é justificada pelas variações nas condições de cultivo, como clima, solo e variedade de sementes.

Cabral et al. (2013) avaliaram 14 amostras de óleo de andiroba de diferentes localidades das ilhas de São Sebastião da Boa Vista – Marajó/PA, Brasil e relataram que os compostos dominantes são o ácido oleico, palmítico e linoleico. Apesar da similaridade da composição química a proporção dos compostos variou entre as amostras. A composição do óleo de andiroba (*Carapa* spp.), o teor e a variabilidade quantitativa de substâncias podem refletir a variabilidade genética da espécie em uma mesma região (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017).

A temperatura é outro fator que influencia diretamente na qualidade de óleos, podendo afetar suas propriedades físico-químicas, levar à rancificação de gorduras e alterar pigmentos quando submetidos a altas temperaturas durante a extração (MENDONÇA et al., 2020).

Novello et al., (2015) avaliando a composição fenólica do óleo de andiroba relataram que o maior teor de compostos fenólicos foi obtido na menor temperatura de extração, a 25 °C, que juntamente com o baixo tempo de processamento levaram à maior atividade antioxidante total (% de inibição DPPH - 1,1-difenil-2-picrilhidrazil), evitando assim uma possível degradação de compostos bioativos nos extratos.

A forma de obtenção pode ocasionar variabilidade na composição química do óleo. Wanzeler et al. (2018) identificaram nove componentes químicos no óleo refinado e dez naquela in natura. No refinado foram identificados os ácidos palmítico, palmitoleico, linoleico, oleico, esteárico, araquídico e behênico, além do glicerol e o 2-monolinolênico. No natural registrou-se os ácidos láurico, palmítico, palmitoleico, linoleico e oleico, o glicerol, 2-monolinolênico, 1-monolinoleni, 1-monooleína e 1-monoestearina.

Reis et al. (2021) verificou técnicas de extração lipídica assistida por ultrassom para verificar as concentrações de limonóides e esteroides. Os autores comentam que a hidrólise não catalisada, apenas a temperatura e a presença de água, pode apresentar baixa eficiência, pois certa quantidade de limonóides e esteróides ficam aderidos às paredes. Neste caso, a utilização de solventes solubilizou as substâncias mencionadas, aumentando a eficiência e reduzindo o tempo de extração. Assim, a

forma de extração do óleo pode ser outro fator de variação na parte quantitativa de substâncias o que, conseqüentemente, influencia na eficiência do óleo.

Outro fator que pode causar variabilidade do óleo de *C. guianensis*, é a forma de armazenamento. Araújo et al. (2017), em seu estudo sobre a composição química e antioxidante do óleo, citam que as sementes foram coletadas e congeladas antes da secagem, seguida do processo de extração do óleo, o que evitou a atividade enzimática relacionada à hidrólise do triacilglicerol e ao processo oxidativo, mantendo as propriedades do óleo.

Informações sobre solventes, tecidos vegetais e métodos de preparação e extração são importantes para a padronização entre os estudos, pois estes fatores podem ter diferentes efeitos na variedade e nas concentrações relativas dos compostos presentes no extrato final (OLIVEIRA et al., 2018).

2.2.2. *Copaifera reticulata* (Copaíba)

2.2.2.1. O gênero *Copaifera*

A copaíba é uma planta Amazônica que pertence ao gênero *Copaifera*. Nas literaturas sobre plantas medicinais, as copaibeiras são muito abordadas por conta do seu óleo-resina que brota do tronco quando há perfuração ou agressão física. Este produto possui altíssimo interesse comercial e com indicações terapêuticas relatadas há séculos (SANTOS et al., 2020).

O nome copaíba tem origem na etnia indígena tupi, Kupa'iwa e kupa'u, e chamada pelos índios de copaíva ou copahu, que significa árvore de depósito se referindo ao seu óleo. A utilização de forma terapêutica desse produto natural possivelmente se deu pelos índios que observaram os animais feridos e que se esfregavam pelo tronco das copaibeiras. Daí os índios passaram a utilizar este produto antes dos portugueses chegarem no Brasil, como anti-inflamatório e cicatrizante nos umbigos de recém-nascidos e nos guerreiros machucados (HECK et al., 2012).

Dados relatados em referências bibliográficas, datam que o primeiro descrito sobre as propriedades do óleo da copaíba foi apresentado em uma carta de Petrus Martius ao Papa Leão X, a qual foi publicada em Estrasburgo em 1534 e que apresentava o nome batizado pelos indígenas de "Copei". Ainda no mesmo trabalho, consta relato de uma publicação da mesma época, "De Natura Novi Orbis", do padre

jesuíta José Acosta que apresenta o interesse das populações brancas por este bálsamo, enaltecendo o excelente odor e potencial de cura de feridas que ao reconhecimento até dos espanhóis. Em meados de 1560, o padre jesuíta José de Anchieta escreveu uma carta ao Padre Geral abordando a essência suave do óleorresina da copaíba e também a sua propriedade terapêutica de cicatrização de feridas sem deixar sinal da cicatriz (VEIGA JR & PINTO, 2002).

A forma de coleta ainda tem um ritual a ser seguido e que é cumprido até a atualidade pelos silvicultores. No início do século XIX, o Príncipe Maximiliano esteve no estado do Espírito Santo e relatou a crença popular da forma como que era realizada a coleta da copaíba. Em suas escritas, observou que a incisão deveria ser feita em dia de lua cheia e o exsudato colhido somente no quarto minguante. Em 1964, no Tratado Único da Constituição Pestilencial, João Ferreira Rosa relatou: “Neste pau, nas noites de lua cheia, quando os frutos estão maduros, se faz golpe até a medula, correr óleo em grande quantidade (VEIGA JR & PINTO, 2002).

Em meados de 1972, o óleorresina de copaíba chegou a ser aprovado pela Food Chemical Codex como complemento aditivo nos alimentos e bebidas devido a ação flavorizante atribuída aos sesquiterpenos presentes no óleo, que são compostos voláteis muito utilizados na indústria alimentícia e na área da cosmetologia em virtude de seu aroma agradável (SANTOS et al., 2020b).

Por conta da grande procura e indicação medicinal, o óleorresina da *Copaifera* já foi considerado uma panaceia, porém sua aplicabilidade terapêutica reduziu bastante por conta do lançamento de novos medicamentos alopáticos mais eficientes e também de muitas ações farmacológicas que foram esquecidas (VEIGA JR & PINTO, 2002).

2.2.2.2. Botânica

O gênero *Copaifera* pertence à família botânica *Leguminosae*, a qual é considerada a terceira maior família de angiospermas com 727 gêneros e 19.325 espécies catalogadas, e inclusa na sub-família *Caesalpinoideae*. Este gênero é considerado Pantropical por ser encontrado da região norte da Argentina até o México, África ocidental e no continente asiático, como apresentado na Figura 6 (SANTOS et al., 2020).

Figura 6 - Regiões onde as espécies do gênero *Copaifera* são mais endêmicas.



Fonte: Veiga Jr & Pinto (2002).

Atualmente, existem 72 espécies já catalogadas de *Copaifera*, das quais mais de 20 são encontradas em solo brasileiro e são popularmente conhecidas como copaíbas ou copaibeiras. No Brasil, é endêmica no Sudeste, Centro-Oeste, Nordeste e Norte e as espécies mais encontradas na Amazônia são a *Copaifera officinalis* L., *Copaifera reticulata* Ducke, *Copaifera multijuga* Hayne, a *Copaifera confertiflora* e a *Copaifera langsdorffii* (PIERI et al., 2012; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; ROCHA et al., 2021b).

As espécies deste gênero correspondem a árvores ou arbustos e se destacam pela sua longevidade que pode chegar até 400 anos e a medir até 40 metros de altura. Seu tronco possui diâmetro de 0,4 até 4 metros e tem casca aromática. Suas folhagens são densas e pequenas, com folhas pinadas alternas com 2 a 12 pares de folíolos (Figuras 7 e 8), apresentam inflorescência branca, às vezes ligeiramente rosadas e sem pétalas. Seus frutos secos são legumes deiscentes com 3,5 cm à 4,0 cm, sementes ovóides negras com um arilo amarelo (ALENCAR, 1981; RANDO et al., 2013; PIERI et al., 2009).

Figura 7 - Folhas alternas em pares de folíolos de um ramo coletado na Floresta Nacional do Tapajós.



Fonte: O autor (2021).

Figura 8 - Espécie de copaíba (*Copaifera reticulata*).



Fonte: O autor.

Com tantas espécies de *Copaifera* existentes e de difícil identificação, as características que podem diferenciá-las são a presença ou ausência de pontuações nos folíolos e com relação às flores, a pubescência das sépalas, o comprimento das anteras e a condição glabra ou não glabra do pistilo (ESCOBAR et al., 2014; VEIGA JR & PINTO, 2002).

Estão habituadas a diferentes tipos de ambientes, como florestas, terra-firme, áreas alagadas, margens dos rios e igarapés que frequentemente inundam, beiras arenosas de lagos e até regiões de matas do cerrado (HECK et al., 2012).

2.2.2.3. O óleorresina de *Copaifera reticulata*

O óleorresina da copaíba possui coloração variando de amarelo ouro à marrom e que é oriundo dos canais esquizo-lizígeos secretores e são formados pela dilatação de espaços intercelulares que é nomeado de meatos e se intercomunicam no meristema. O óleo é encontrado em todas as regiões do vegetal e se acumula nas cavidades internas formando bolsas no interior da medula do caule de árvores jovens, nas folhas e xilema primário. Esses bolsões, como são chamados, não se comunicam entre si e é por isso o costume dos extratores de perfurar mais de um orifício em diferentes pontos. Esse óleo brota também quando a árvore apresenta condições patológicas, o que caracteriza esse exsudato um produto da desintoxicação e mecanismo de defesa contra animais, fungos e bactérias (BIAVATTI et al., 2006; HECK et al., 2012; PACHECO; BARATA; DUARTE, 2006; PIERI; MUSSI; MOREIRA, 2009; SILVA MEDEIROS; VIEIRA, 2008).

Como técnica adequada e não agressiva para a extração deste óleo, utiliza-se um método que consiste na perfuração de dois orifícios com um trado (2 cm de diâmetro e 45 cm de comprimento) na altura entre 1,0 e 1,50 m acima da base da planta. Logo após o escoamento do óleo, os orifícios são vedados com cano de Policloreto de Vinila (PVC) com $\frac{3}{4}$ de diâmetro e 10 cm de comprimento contendo uma tampa de plástico que é utilizada para facilitar coletas futuras e proteger o vegetal contra possíveis parasitas, conforme Figura 9 (OLIVEIRA; LAMEIRA; ZOGHBI, 2016). O rendimento da coleta de óleorresina pode variar de 0,3 a 3 litros do produto por árvore. No entanto, pode-se esperar que em algumas ocasiões há copaíbas produzindo até 30 litros em única coleta (SOUZA; HIGUCHI, 2014).

Figura 9 - Extração do óleo de copaíba em uma árvore de *C. reticulata* na FLONA do Tapajós.



Fonte: O autor.

Cada óleorresina apresenta características individuais no aspecto da cor, odor, densidade, viscosidade e composição química. Com a grande diversidade de espécies do gênero, juntamente com a alta procura pelo produto e ainda a similaridade entre os vários tipos presentes, isso veio a contribuir com a adulteração dos óleos de outras procedências, o que dificulta a identificação correta de uma única espécie e a aplicabilidade terapêutica correta de um óleo (LIMA et al., 2020).

Além do uso medicinal, o óleorresina de copaíba ainda contribui para o processo da bioeconomia regional nas comunidades amazônicas. O litro extraído da madeira quando comprado direto do extrativista pode custar até R\$30,00. Este mesmo produto quando beneficiado pelo atacadista poderá ser comercializado por até R\$200,00. Desse valor, quando chega no varejista, o óleo é fracionado e vendido por R\$300,00 o litro (SANTOS; GUERRA, 2010). No trabalho de (GONÇALVES et al., 2012), que realizaram um levantamento na Flona do Tapajós, observaram que o valor médio citado pelos entrevistados era de R\$15,00 quando comprado direto do produtor.

Apesar de algumas características serem comuns aos óleos da copaíba, existe um grande problema no que se refere a identificação das espécies desse produto e também na padronização de sua caracterização química (LIMA et al., 2020). A caracterização química dos óleorresina da *Copaifera* é fundamental para relacionar a composição química com a possível atividade biológica e, assim, permitir o

lançamento de um novo fitoterápico com segurança e eficácia com controle de qualidade adequado (PACHECO; BARATA; DUARTE, 2006). Este óleorresina é muito susceptível a influência de diversos fatores, como diferenças metabólicas entre indivíduos do mesmo gênero e até da mesma espécie botânica, sazonalidade como estação chuvosa, temperatura, umidade, tipo e nutrientes de solo, altitude, temperatura, intensidade da luz, idade da planta e ainda adulteração por conta do processo produtivo ser de maneira artesanal. Todos os fatores levam a alterações na variabilidade da concentração e dos metabólitos (J. J. M. SILVA et al., 2020; VEIGA JR & PINTO, 2002).

O óleo é constituído majoritariamente por sesquiterpenos, que emitem um odor agradável em função de ser óleo essencial, e diterpenos não voláteis que são responsáveis pela característica resinosa e rico em ácidos diterpênicos. Daí se originou o nome óleorresina ao líquido extraído dos troncos das copaibeiras (SANTOS et al., 2020a).

Este exsudato pode ser utilizado na sua consistência pura, conforme a forma que brota dos troncos das copaibeiras, na forma destilada, e ainda pode ser aplicada como um componente na preparação de uma variedade de produtos com fins terapêuticos ou cosméticos, como xaropes, sabonetes, shampoos, detergentes, pomadas, cápsulas, óvulos vaginais, cremes, loções, fixador de fragrâncias e na indústria química de tintas como fixador de vernizes (BIAVATTI et al., 2007; GARCIA; YAMAGUCHI, 2012; RIGAMONTE-AZEVEDO; WADT; WADT, 2006).

Seu óleorresina é muito conhecido devido às várias propriedades medicinais, como antiinflamatório, cicatrizante, antiasmático, expectorante, antiúlcera, antitumoral, antisséptico, antifúngico, antibacteriano e tratamento de incontinência urinária, cistite e leucorréia (BIAVATTI et al., 2006; BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA et al., 2008). Essa ação terapêutica, segundo estudos, é atribuída à rica presença dos sesquiterpenos, inclusive do β -cariofileno, o qual é caracterizado como marcador químico do gênero (LIMA et al., 2020). Apesar da alta presença desses compostos nos oleorresinas, as atividades biológicas dos metabólitos secundários podem ser sinérgicas ou aditivas, em vez de serem causadas exclusivamente por compostos individuais (MALHEIROS et al., 2020).

Com essa riqueza de metabólitos secundários, aos quais são atribuídos os efeitos farmacológicos, o óleo de copaíba é considerado um produto de uso mundial

e muito exportado pelo Brasil. Esse interesse comercial ocorre devido o produto da copaíba ser considerado um ótimo cicatrizante, antiinflamatório, ajuda no tratamento de vírus como *Herpes simplex* e ser parte constituinte das farmacopeias da Inglaterra e dos Estados Unidos. No entanto, esse azeite natural poderá constituir ainda um produto de alto valor na questão de saúde pública e na esfera econômica em curto prazo (GILBERT, 2006).

2.2.2.4. Composição química do óleo-resina de *Copaifera*

A composição química do óleo-resina da *Copaifera* é muito susceptível a influência de diversos fatores, como diferenças metabólicas entre espécies do mesmo gênero e até da mesma espécie botânica, sazonalidade como estação chuvosa, temperatura, umidade, tipo de solo, idade da planta e ainda adulteração por conta do processo produtivo ser de maneira artesanal (SILVA et al., 2020).

O óleo-resina da copaíba é constituído por um extenso grupo de moléculas orgânicas conhecidas como terpenos que são batizadas como “alcenos naturais”, visto que apresentam uma dupla ligação carbono-carbono sendo caracterizado como um hidrocarboneto insaturado. Esses produtos são sintetizados pelas plantas como metabólitos secundários e possuem função de evitar injúrias por agentes externos (FELIPE; BICAS, 2017). Dentre as substâncias já apresentadas neste óleo têm-se os sesquiterpenos: cariofileno, óxido de cariofileno, α -humuleno, δ -cadineno, α -cadinol, α -cubebeno, α e β -selineno, β -elemeno, trans- α -bergamoteno e β -bisaboleno. Já os diterpenos mais comuns presentes na fração são os ácidos copálico, poliáltico, hardwíckiico, caurenóico, 3-hidróxi-copálico, 3-acetóxi-copálico e ent-agático (SANTOS et al., 2020a).

Essas variabilidades terpênicas são originadas de uma cadeia de reações bioquímica, sendo então provenientes do isopentenil difosfato (IPP) ou de seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP), os quais possuem rotas metabólicas diferentes - via do mevalonato, que acontece no citosol das plantas, e via do 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP). O DMAPP e IPP são acoplados juntos de uma forma cabeça com a cauda para formar o monoterpene de 10 carbonos. Em seguida, a este é acoplado a outra molécula de IPP para formar o sesquiterpene com 15 carbonos em sua molécula e com o acoplamento de outra molécula de isopentenil difosfato, produz o diterpene qual possui 20 carbonos (KITAOKA et al., 2015).

Os sesquiterpenos constituem parte do óleo de copaíba e são considerados um grupo de metabólitos secundários e que estão presentes em muitos produtos de origem vegetal. Sua massa molecular é considerada pequena, o que favorece a sua volatilidade. Eles apresentam odor agradável e estão presentes na fração do óleo essencial da amostra. A grande diversificação de sua estrutura molecular e o enorme potencial farmacológico o tornam este grupo de excepcional interesse (FELIPE; BICAS, 2017; FRANCOMANO et al., 2019; SANTOS et al., 2020a).

Um exemplo de sesquiterpenos encontrado no óleo-resina é o β -cariofileno que é dos principais constituintes deste produto por conta de sua altíssima concentração. Ele é considerado um canabinóide antiinflamatório possuindo o potencial de se ligar e atuar como agonista no receptor canabinóide tipo 2 (CB2) e dessa forma ativá-lo. Também pode inibir as vias de sinalização que promovem a expressão de citocinas pró-inflamatórias e a resposta imunitária TH1, sendo assim ele inibe a expressão de citocinas pró-inflamatórias e atua na diminuição da inflamação (FRANCOMANO et al., 2019). Segundo estudos já publicados, essa substância é um modulador do sistema nervoso central e exerce efeitos benéficos em algumas doenças neurodegenerativas, inflamatórias, oncológicas, ósseas e ainda atua como antimicrobiano (FRANCOMANO et al., 2019; D. G. SANTOS et al., 2020b).

Outra classe de metabólitos secundários presente no óleo-resina de copaíba são os diterpenos, que são substâncias formadas por quatro unidades de isopreno, totalizando uma quantidade de 20 carbonos em suas moléculas (Felipe & Bicas, 2017). Eles correspondem a fração não volátil do produto e conferem ao óleo a característica resinosa e rica em ácidos diterpênicos (D. G. SANTOS et al., 2020b).

D. G. Santos et al., (2020b) analisaram quimicamente o óleo-resina da *Copaifera reticulata* e suas frações contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos e os sesquiterpenos oxigenados obtidas a partir do fracionamento fracionada do óleo que foi obtido na cidade de Mojú no estado do Pará. Na fração contendo os hidrocarbonetos sesquiterpênicos foram identificados os constituintes majoritários: β -bisaboleno (48,9 %), trans- α -bergamoteno (23,4 %) e β -cariofileno (12,0 %). E para a fração contendo os sesquiterpenos oxigenados os compostos majoritários foram: β -bisabolol (16,7 %), óxido de cariofileno (11,8 %) e allo-himachalol (9,8 %).

Bardají et al., (2016), que também estudou o óleo-resina de *C. reticulata*, coletado em Brasil Novo no estado do Pará, após a hidrodestilação com aparelho de

Clevenger identificou os constituintes majoritários, para os hidrocarbonetos sesquiterpênicos: β -bisaboleno (24,91 %), trans- α -bergamoteno (21,99 %) e β -selineno (12,17 %). Para os sesquiterpenos oxigenados foram identificados somente o α -bisabolol (0,17 %) e o óxido de cariofileno (0,21 %).

Lima, T. C. P. et al. (2020), realizaram a caracterização química do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, da cidade de Belterra (Pará, Brasil), em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) e determinou a presença majoritária de β -cariofileno (39,91%), seguido do α -bergamoteno (11,32%), β -bisaboleno (7,38%), α -humuleno (3,15%) e β -selineno (1,72%), predominando nesta amostra os compostos voláteis em relação aos compostos resinosos. G. A. G. de Souza et al. (2017) também analisaram quimicamente o óleo-resina da *C. reticulata* coletada na região, anteriormente relatada, e identificaram como componentes majoritários os sesquiterpenos β -cariofileno (41,7%) e β -bisaboleno (18,6%), que também estão presentes no estudo realizado por Lima T. C. P. et al. (2020), porém em proporções diferentes.

No estudo realizado por Almeida Júnior et al. (2021), foi abordado pelos pesquisadores o uso do óleo-resina de *C. reticulata* numa composição química incomum. O resultado da análise no cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas mostrou a presença majoritária dos sesquiterpenos β -bisaboleno (25,15 %), cis-eudesma-6,11-dieno (14,20%), trans- α -bergamoteno (12,76 %), β -selineno (8,70 %), α -selineno (7,03 %). Já a fração diterpênica, no estudo foi apresentado o caureno (1,30 %). Assim, os pesquisadores justificam essa variação química do óleo-resina do gênero *Copaifera*, à espécie, localização, variações sazonais, intensidade luminosa, nutrientes do solo e ataque de patógenos e herbívoros.

Ziech et al. (2013) também estudaram o óleo-resina de *Copaifera reticulata* coletada na cidade de Belterra (Pará). O método de estudo dos componentes voláteis foi determinado por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS), a partir do qual foi possível identificar a presença dos sesquiterpenos β -cariofileno (37,6%), β -bisaboleno (14%), (E)- α -bergamoteno (9,3%), α -humuleno + (E)- β -farneseno (5,3%) e β -silenos (4,9%).

Portanto, diante do que foi exposto por Lima, T. C. P. et al., (2020) e Ziech et al. (2013), observa-se que em estudos com a mesma espécie, coletadas na mesma

região, podem apresentar um perfil diferenciado quanto à química e principalmente com relação à concentração dos principais metabólitos secundários, os quais podem variar conforme época do ano, pluviosidade, temperatura, entre outras (SILVA, J. J. M. et al., 2020).

A partir do óleo-resina coletado da *Copaifera reticulata* na Estação Ecológica de Jari, em Almeirim (Pará, Brasil), Malheiros et al. (2020) identificaram quimicamente os constituintes químicos por GC-MS e determinaram a presença majoritária de sesquiterpenos, como o γ -macrocarpino (14,2%), α -trans-bergamoteno (13,6%), β -selineno (13,4%), β -cariofileno (11,7%) e α -selineno (9,07%).

Nos estudos de Corrêa et al. (2021) em coleta do óleo-resina de *Copaifera reticulata* na estação da Floresta Nacional do Tapajós, Belterra, Pará, no Km 67 da rodovia BR 163, os autores observaram que os compostos majoritários presentes na amostra eram o beta-cariofileno (37,6 %), Trans-alfa-bergamoteno (9,3%), beta-bisaboleno (13,9 %), beta-selineno (4,9 %), alfa-humuleno + (E)-b-farneseno (5,3 %).

Kobayashi et al. (2011), avaliaram por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, o óleo-resina de *Copaifera multijuga*, coletado em uma reserva localizada no estado do Amazonas, e foram observados a presença dos sesquiterpenos β -cariofileno (36,03%), α -copaeno (18,75%), β -bisaboleno (8,54%), α -trans-bergamoteno (7,04%), δ -cadineno (6,07%) e α -humuleno (3,79%). Neste trabalho ainda é relatado que o constituinte majoritário do óleo-resina tem efeitos anti-inflamatórios e anestésicos, além de atividades antimicrobiana e antioxidantes.

No estudo realizado por Silva J. J. M. et al., (2020), com vários óleos-resinas de origem comercial e *in natura*, verificou-se diferenças qualitativas e quantitativas na composição química destes óleos. Os sesquiterpenos α -ciclopaeno, β -elemeno, β -cariofileno e trans- α -bergamoteno foram identificados em todas as amostras investigadas, porém em percentuais diferentes. Segundo os autores, esses resultados são justificados por fatores genéticos das espécies e exposição a fatores abióticos. Como exemplo da grande variabilidade entre as espécies do mesmo gênero, o óleo de *C. multijuga* Hayne, apresentou 44,73% de β -cariofileno enquanto o óleo da *C. oblongifolia* apresentou 0,29% da mesma substância. Na comparação da concentração do β -elemeno, a variação foi de 27,61% na *C. oblongifolia* para 0,82% no óleo-resina de *C. trapezifolia* (0,82 %).

Simões et al., (2016) realizaram a coleta do óleo-resina de *Copaifera multijuga* na reserva de Ducke, do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (Amazonas) e caracterizaram quimicamente por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (GC-FID) e um detector de espectrometria de massa (GC-MS). Após análise dos dados obtidos, foi possível observar que o produto estudado apresentava majoritariamente compostos sesquiterpênicos, sendo basicamente constituídos por β -cariofileno e seu óxido.

A composição química do óleo-resina e do óleo essencial de *Copaifera multijuga* (Santarém, Pará), obtido por destilação foi avaliada por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS). Foram observados a presença de 23 constituintes no óleo-resina, sendo os majoritários o β -cariofileno (67,07%), α -humuleno (10,87%) e trans- α -bergamoteno (6,08%). Já na fração do óleo essencial foram identificados 7 constituintes, sendo o β -cariofileno (57,29%), óxido de cariofileno (10,34%), α -humuleno (9,11%), como substâncias majoritárias. Os autores ressaltaram a relevância das grandes variações do óxido-de-cariofileno ao qual atribuem uma provável ação antifúngica (DEUS; ALVES; ARRUDA, 2011).

Carneiro et al. (2020) estudaram os óleos-resinas de *Copaifera multijuga*, coletada em Manacapuru (Amazonas), *Copaifera pubiflora* coletado em Mucajá (Roraima) e *Copaifera trapezifolia* colhido em São Miguel Arcanjo (São Paulo). A partir da *C. multijuga* foram identificados como principais metabólitos secundários o β -cariofileno (45,65%), α -humuleno (15,47%) e α -copaeno (14,05%). Já na *C. pubiflora* foi verificado a presença do β -cariofileno (27,28%) e β -elemeno (17,37%) e na *C. trapezifolia*, foram observados a presença β -cariofileno (32,05%), D-germacreno (11,00%) e espatulenol (7,5%). Nestas amostras avaliadas, observa-se que o β -cariofileno esteve presente como composto majoritário, conforme relatado na literatura.

2.2.3. *Libidibia ferrea* (Jucá)

2.2.3.1. O gênero *Libidibia*

A espécie *Libidibia ferrea* (Fabaceae), subfamília Caesalpiniaceae (Caesalpinoideae, Leguminosae), que anteriormente recebia a nomenclatura científica de *Caesalpineia ferrea*, destaca-se por conta de sua importância etnofarmacológica, econômica e ser vegetal nativo da flora brasileira. Endêmico no

Cerrado, Caatinga, Amazônia e Mata Atlântica é popularmente conhecida como “Jucá” ou “pau de ferro” e pelos indígenas imirá-itá, ibirá-obi, muiré-itá, muirá-obi e jucaína. O nome jucá vem de origem tupi que significa quebra-pescoço, “Aîura” representa pescoço e “ká” é quebrar. No Nheengatu a palavra “îuká” significa matar e sua árvore, que possui uma madeira de dureza alta, era utilizada para a construção de tacapes que seriam utilizados para tirar a vida de prisioneiros (ALMEIDA; FURTADO; BARCELLOS, 2021; AMÉRICO et al., 2020; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015; MACÊDO et al., 2020).

O pau de ferro compõe um dos 71 vegetais contidos na lista de plantas medicinais de interesse do sistema de saúde brasileiro e foi incluída no Formulário Nacional de Fitoterápicos. Este vegetal é muito difundido popularmente como planta medicinal e tem uso como chás, decocções, infusões, xaropes e macerações. Diversas partes dessa espécie, como casca, folhas, frutos e sementes, são utilizadas amplamente pelo ser humano (GUILHON-SIMPLICIO ET AL., 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2022).

As cascas do caule da árvore possuem efeito expectorante, descongestionante, antitussígeno, antidiabético, antidiarreico, no tratamento de infecções entéricas, reumatismo, cicatrizante, analgésico, antiinflamatório e ainda auxilia na perda de peso. Os frutos estão relacionados ao efeito antidiarreico, antianêmicos, antidiabéticos, prevenção do câncer, tratamento de infecções bacterianas e fortificante. Já as sementes apresentam efeito depurativo e ainda é aplicado no tratamento de hematomas (AMÉRICO et al., 2020; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015).

Este vegetal não é nativo do domínio fitogeográfico da Amazônia, os responsáveis pela sua dispersão para outras regiões foram os nordestinos que estavam em processo de imigração para demais áreas geográficas do Brasil, por conta do ciclo do “boom da borracha” e atividades garimpeiras, e levavam estas plantas que tinha muita importância no seu dia a dia por conta de suas propriedades etnofarmacológicas na sua região natal. Atualmente, a espécie está presente em diversos quintais da região norte e nordeste com aproveitamento como árvore de sombra e para produção de frutos com fins medicinais (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015; KFFURI et al., 2020).

2.2.3.2. Botânica

A família Fabaceae compreende a ordem taxonômica das plantas com flores dicotiledôneas e está subdividido em quatro famílias e 754 gêneros, dos quais Fabaceae é a família principal. A característica dessa ordem é a multiplicidade de vagens com sementes presentes em uma fileira e a coexistência de raízes com bactérias fixadoras de nitrogênio que aliviam o crescimento das plantas em solos pobres (POURNAGHI et al., 2020).

A família Fabaceae possui distribuição cosmopolita, a qual contém aproximadamente gêneros e cerca de 18 mil espécies. É considerada uma das maiores famílias de Angiospermas e uma das mais importantes economicamente. No território brasileiro já está catalogado a presença de 200 gêneros e 1.500 espécies dessa família. Como caracteres principais, têm-se a presença de frutos em forma de vagem (com exceções) e está contida desde espécies arbóreas até espécies herbáceas, no qual cita-se as de maior importância econômica e alimentar, como a soja e feijão (CARVALHO & GAIAD, 2021).

A *Libidibia*, como um dos gêneros da família Fabaceae, possui mais de 500 espécies que são distribuídas principalmente em países de clima tropicais ou subtropicais. Este gênero corresponde a árvores perenes e arbustos e se destacam pelo seu cultivo como plantas ornamentais e pelo uso medicinal (POURNAGHI et al., 2020).

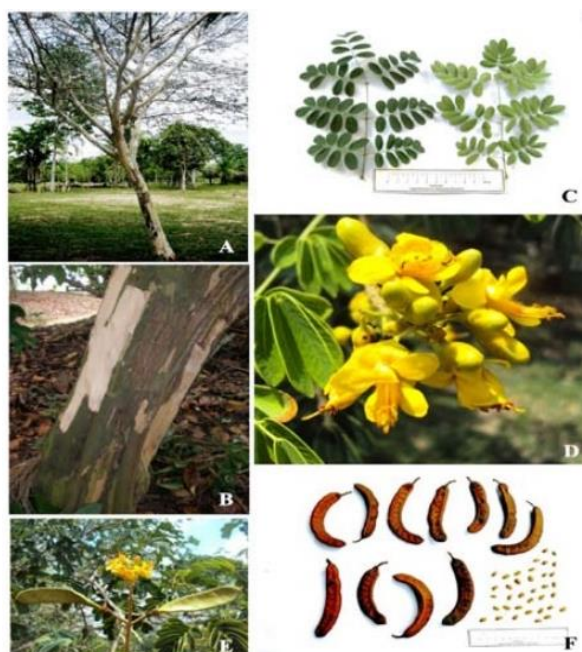
O jucá (*Libidibia ferrea*) é uma planta arbórea, medindo cerca de 10 a 15 m de altura, dossel exuberante e amplo, possui folíolos e folhas adultas alternadas que chegam a medir entre 7 e 20 cm de comprimento, em formato ovalar e com caráter hidrofóbico. Possui núcleo duro, tronco liso e escamoso, com 40-60 centímetros (cm) de diâmetro. As inflorescências apresentam flores com pétalas amarelas, formato obovado e manchas avermelhadas. O período de floração compreende do fim de novembro até meados do mês de janeiro, se apresentando com pequenas flores em forma de galhos amarelos. O período de amadurecimento dos frutos acontece entre os meses de julho até agosto (ALMEIDA; FURTADO; BARCELLOS, 2021; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015). O nome da espécie (*L. ferrea*) faz jus a alta concentração de ferro na madeira do vegetal (FERREIRA & SOARES, 2015).

Os frutos de vagens indeiscentes, com forma oblonga, ligeiramente achatada e sinuosa com dimensões médias de 8,3 x 1,8 x 0,8 cm. Quando imaturas são de cor

verde e quando maduras são de cor marrom, comportamento que se repete com as sementes. Suas sementes são de forma discoide ou ovóide, com base achatada e ápice arredondado, coloração variando de verde claro ao amarelado, com dimensões médias de 0,9 x 0,5 x 0,5 cm. Apresentam consistência firme e opaca, com tegumento levemente enrugado, separados em poços individuais distintamente visíveis e apresentam arranjo cruzado unisseriado (Figura 10) (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015; MACÊDO et al., 2020).

Libidibia ferrea é uma espécie exigente que necessita de água para o seu crescimento, pois quando submetida a condições de estresse hídrico se observa redução relevante em sua altura e número de folhas, indicando que as restrições de abastecimento de água prejudicaram o desenvolvimento de suas características morfológicas e fisiológicas (MACÊDO et al., 2020).

Figura 10 - Imagens de *Libidibia ferrea* (Jucá). (A) Árvore do jucá. (B) Caule da árvore do jucá. (C) Detalhe das folhas do jucá. (D) As flores do jucá. (E) Inflorescência e frutos. (F) Detalhes de frutos e sementes.



Fonte: Guilhon-Simplicio et al. (2015).

2.2.3.3. O extrato de *Libidibia ferrea*

O uso tradicional de extratos do jucá como alternativa em terapias se tornou uma atividade comum em algumas regiões, como no sertão e também na amazônia. Dentre as atividades relatadas com esse produto natural, têm-se: sífilis, câncer, depurativo, diabetes, reumatismo, impotência sexual, fraturas ósseas, dores de cabeça, distúrbios do sistema respiratório, febre, diarreia, problemas renais,

ansiolítico, problemas de visão, anemia, cólicas, antiinflamatórios, cicatrizante, analgésicos, redução de hematomas, gastrites, dor de estômago, infecções urinárias e tremores (AMÉRICO et al., 2020; MACÊDO et al., 2020).

Vários são os estudos publicados com interesse no mapeamento da composição do jucá, quais demonstraram uma diversidade de classes químicas e compostos nos extratos de diferentes partes anatômicas desta planta. Entre as classes dos metabólitos secundários que mais se apresentam, destacam-se os Flavonóides, polissacarídeos, açúcares redutores, ácidos orgânicos, saponinas, quinonas, antraquinonas, cumarinas, fenóis, terpenóides e taninos. Como principais metabólitos secundários encontrados comumente na *L. ferrea*, têm-se os ácidos fenólicos, ácido gálico e ácido elágico (AMÉRICO et al., 2020; KOBAYASHI et al., 2015; MACÊDO et al., 2020; POURNAGHI et al., 2020).

Em pesquisas da sua composição química, o jucá demonstrou que pode variar em função da área de plantio, solo, condições climáticas, época de colheita, processamento e partes da planta utilizadas no preparo da planta. No entanto, taninos, fenóis e quinonas foram encontrados em todos os testes fitoquímicos realizados, o que indica que esses compostos podem estar presentes no extrato, independentemente do solo, clima ou variáveis da planta (KOBAYASHI et al., 2015).

Dos produtos colhidos da árvore, diferentes partes anatômicas podem produzir um produto com atividade terapêutica. Por exemplo, das vagens colhidas da planta *L. ferrea* se pode produzir o extrato etanólico que apresenta com coloração marrom-escuro (Kobayashi et al., 2015). Nos extratos hidroalcóolicos da casca, folhas e caule mostraram a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas esteróis e compostos fenólicos. No entanto, derivados antracênicos e traços de saponinas, glicosídeos cardiotônicos e alcaloides também foram relatados. As vagens colhidas do vegetal, no extrato etanólico, pode apresentar coloração marrom-escuro e como constituintes o ácido gálico, ácido elágico e o galato de metila. O extrato benzênico dos frutos dessa planta forneceu sitosterol, ácido palmítico e octacosanóico. Pauferrol, um trímico de chalcona isolado de um extrato de acetona dos caules, é um importante marcador fitoquímico da espécie (GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015).

No estudo de Américo et al. (2020), foi pesquisado a composição química do extrato etanólico das vagens do jucá coletado na área urbana da cidade de Santarém – Pará. Como resultados alcançados, os pesquisadores observaram que o produto

fruto de uma extração etanólica apresentou o teor de 3,1% de compostos fenólicos, dentre eles taninos e flavonóides hidrolisáveis.

Macêdo et al. (2020) desenvolveram uma revisão bibliográfica que investigava a composição química do Jucá em 23 trabalhos científicos selecionados. Nos estudos fitoquímico dos extratos hidroalcoólico, clorofórmico, n-hexano e acetato de etila, mostrou a presença de vários constituintes, dentre eles ácido oxálico, ácido esteárico, ácido mirístico, palmitato de metila, ácido palmítico, óleo de metila, ácido araquidônico, entre outros.

Araújo et al. (2014) também realizaram estudos com o jucá e obteve um extrato da casca da árvore por turboextração com água e cetona por um período de 20 minutos. Como resultados alcançados, revelou a presença de taninos condensados (catequinas) e taninos hidrolisáveis (ácido gálico).

Dias et al. (2013) realizou extração dos frutos do jucá pelo método de fluído supercrítico com CO₂ e analisou por cromatografia gasosa. Observou que estavam presentes nos frutos ácidos graxos insaturados e saturados, ácido linoleico (42,38%), ácido palmítico (19,28%), ácido eláídico (9,17%), gama-sitosterol (8,39%), ácido esteárico (7,16%) e lupenona (4,67%).

Sawada et al. (2014) também identificaram a presença de ácidos graxos na porção lipídica das sementes, sendo encontrado em maior quantidade os ácidos graxos insaturados, ácido linoleico (32,82%), oleico (21,79%), linolênico (7,50%), palmitolênico (5,48%), e os ácidos graxos saturados, palmítico (17,37%), esteárico (5,31%) e cáprico (9,73%). O autor relata sobre a alta concentração do ácido linoleico que pode ser comum ao gênero *Caesalpinia* (atualmente *Libidibia*) visto que na *Caesalpinia sappan* e *Caesalpinia echinata* o referido composto também é o principal componente.

Kobayashi et al. (2015) realizaram a extração em temperatura adequada por 7 dias do extrato dos frutos de *Libidibia ferrea* e, nas análises fitoquímicas, foram reveladas a presença saponinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, fenóis e taninos, sesquiterpenos lactonas e antraquinonas. Os autores ainda complementaram que a composição química do produto estudado pode sofrer variações conforme alguns fatores, como a área de crescimento, o solo, as condições climáticas, o tempo de colheita, processamento e a parte da planta utilizada para a preparação do extrato.

Os taninos, fenóis e quinonas estão presentes em todas os ensaios fitoquímicos que já foram estudados. Diante dessas observações, provavelmente estes compostos sempre serão encontrados no extrato desta planta, independentemente das variáveis de solo, clima ou parte da planta (Kobayashi et al., 2015).

2.3. Toxicidade de Plantas Medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) faz o seu papel encorajando a população a praticar o uso de plantas medicinais e fitoterápicos no tratamento de várias doenças comuns como feridas, constipação, dispepsia, artrite, hiperlipidemia, infecções do trato respiratório, dentre outras (Ferreira et al., 2022). Adicionalmente ao fortalecimento da fitoterapia, a OMS aumentou a vigília no que se refere à segurança dos fitoterápicos e ressalta a importância dos testes toxicológicos antes da aplicação terapêutica das plantas medicinais (SUBRAMANIAN; SANKARAMOURTHY; GUNASEKARAN, 2018).

Desde os tempos antigos os vegetais considerados nocivos ao organismo são utilizados pelo ser humano, estes vegetais eram utilizados em envenenamentos intencionais, seja por suicídio ou homicídio, em atos recreativos, crenças populares, rituais indígenas, caça ou até como formas terapêuticas para descoberta de novos medicamentos (CAMPOS et al., 2016).

Atualmente as plantas medicinais têm servido de escolha para a população como alternativa aos medicamentos industrializados. Entretanto, essas alternativas devem ser baseadas em produtos que tenham uso seguro a fim de evitar intoxicações ocasionada pela administração incorreta dos vegetais ou seus subprodutos (CAMPOS et al., 2016).

Naturalmente nos vegetais considerados terapêuticos existem um *pool* de substâncias químicas que podem apresentar tanto propriedades benéficas quanto maléficas. As ações do sinergismo entre aqueles metabólitos secundários podem produzir hábitos saudáveis para o organismo, como é o caso da associação do chá verde e o chá preto que possuem efeitos antioxidantes e ajudam a prevenir a formação do câncer, doenças relacionadas ao coração, entre outras. No entanto, o uso de plantas medicinais ou a associação delas nem sempre pode ser vantajosa, pois se pode gerar agravos a saúde e efeitos exacerbados, principalmente no público mais

susceptível a essas complicações, como idosos e gestantes (PEDROSO; ANDRADE; PIRES, 2021).

Assim, uma avaliação do potencial toxicológico das substâncias é de fundamental importância para garantir o uso seguro das plantas medicinais (Souza et al., 2006). Os distúrbios ocasionados por estas plantas podem se relacionar aos fatores ligados ao indivíduo ou a planta. Efeitos como alergias na pele e mucosas, distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e em alguns casos até o óbito, são alguns dos diversos efeitos ocasionados pelo uso inadequado de plantas medicinais (CAMPOS et al., 2016).

Para conseguir controlar as estatísticas, coordenar a coleta, a compilação dos dados, a análise e a divulgação dos casos de intoxicação e envenenamento notificados no Brasil, em 1998 foi criado o Programa Nacional de Informações sobre Plantas Tóxicas. Como ferramenta organizacional, os registros iniciais são realizados pelos Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Ciats), que estão sediados em alguns estados do país que contemplam a Rede Nacional de Centros de Informação e Assistência Toxicológica (Renaciat). Nesses Ciats são disponibilizados os serviços de orientação a população e aos profissionais de saúde sobre as informações e medidas a serem adotadas em casos de intoxicação. As notificações são encaminhadas ao Sistema Nacional de Informações Toxico-farmacológicas (SINITOX), responsável pela consolidação e divulgação anual dos dados em âmbito nacional (CAMPOS et al., 2016; SINITOX, 2022).

Com os dados liberados pelo SINITOX, observa-se que no ano de 2012 foram notificados 1026 casos de intoxicações humanas decorridos do uso indevido de plantas. Já no ano de 2017, esses dados eram de apenas 821 casos notificados de intoxicações pelo mesmo agente. Estes números baixos, parecem ser fruto da não obrigatoriedade da notificação dos eventos toxicológicos no Brasil, o que favorece a subnotificação (CAMPOS et al., 2016; SINITOX, 2022).

Para as doenças acima citadas, diversos vegetais e metabólitos ativos foram identificados e descritos nas literaturas, comprovando a eficácia. No entanto, há um interesse considerável em mensurar os riscos que esses produtos podem representar para a saúde, pois muitas dessas plantas contêm compostos que são conhecidos por causar doenças ou provocar até a morte em animais e humanos (Souza et al., 2006). Da mesma forma que esses produtos popularmente são considerados bons remédios,

também podem expor o indivíduo ao risco de intoxicação fruto do uso indevido e prescrição de forma errônea (FERREIRA et al., 2022).

Para a escolha de plantas com fins terapêuticos deve ser levado em consideração a identificação correta do vegetal, conhecimento de qual parte anatômica da planta deve ser usada, modo de preparo, forma de uso, conhecimento da dose, orientação adequada, sempre tomando conhecimento das contraindicações e os efeitos tóxicos que podem provocar (FERREIRA et al., 2022; PEDROSO et al., 2021).

Os estudos pré-clínicos ou não clínicos, como são classificados os testes toxicológicos de drogas antes de ser lançado no mercado, servem como base para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, entre eles os fitoterápicos. Essa avaliação da segurança visa antecipar os riscos envolvidos nas novas formulações, reduzindo os efeitos adversos e deletérios aos seres humanos e animais. Essas investigações podem ser desenvolvidas por testes *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in vitro* tem bastante importância e vem recebendo bastante atenção pelas comunidades internacionais de regulação de produtos farmacêuticos em decorrência do movimento social para reduzir e refinar o número de animais usados na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos. No entanto, alguns testes *in vivo* são imprescindíveis à fase pré-clínica pois fornecem informações mais precisas sobre a segurança e eficácia dos novos fármacos (SILVA et al., 2021b).

Muitas drogas naturais são utilizadas cotidianamente pela população mundial, e em especial do Brasil. Logo, para melhor segurança dessas terapias, são necessários testes padronizados para determinação da toxicidade das plantas medicinais. Estes métodos devem ser realizados conforme diretrizes da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD), Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (ANVISA), entre outras normas padronizadas por outros países, para poderem ser aceitos pelos órgãos reguladores (ANVISA, 2013).

2.3.1. Estudos toxicológicos relacionado à Andiroba

Testes de toxicidade aguda, reprodutiva e crônica são fundamentais para a estimativa da segurança de produtos de origem vegetal. O óleo vegetal extraído da semente da *Carapa guianensis* (andiroba) é um produto muito utilizado pela

população devido suas propriedades fitoterápicas. Apesar do uso comum pela população, existem poucos dados científicos que avaliam a toxicidade desta espécie (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017; PAUMGARTTEN et al., 2016).

Os lipídios desempenham um papel importante na toxicidade dos óleos naturais, e a investigação da composição lipídica pode fornecer informações sobre sua contribuição para a atividade biológica (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017). O óleo de andiroba é composto em grande parte por ácidos graxos, onde alguns possuem importantes propriedades antioxidantes (NOVELLO et al., 2015; PORFÍRIO-DIAS et al., 2020; SILVA et al., 2021b).

De acordo com experimentos, pode-se sugerir que a toxicidade do óleo de andiroba via oral é muito baixa em camundongos e que bioensaios para se avaliar a toxicidade devem ser aplicados com doses superiores a 2,0 g/kg e 5,0 g/kg de peso corporal (MIRANDA JÚNIOR et al., 2012).

Nayak et al. (2010) estudaram a toxicidade aguda em ratos do extrato da casca de *C. guianensis*. com doses crescentes (250, 500, 1.000 e 4.000 mg/kg de peso corporal) por 14 dias. As doses até 1.000 mg/kg de peso corporal não produziram qualquer sinal de toxicidade e mortalidade.

Em outro estudo, Costa-Silva et al. (2008) avaliaram a toxicidade aguda (0,625, 1,25, 2,5 e 5,0 g/kg por 14 dias) e subaguda (0,375, 0,75 ou 1,5 g/kg por 30 dias) do óleo da semente de *C. guianensis* administrada via oral em ratos *Wistar*. A análise hematológica não apresentou diferenças significativas nos parâmetros examinados. Entretanto, nos parâmetros bioquímicos, ocorreu aumento do nível sérico de alanina aminotransferase (ALT) (29%) e no peso absoluto e relativo do fígado (18,7 e 33,1%), no tratamento subagudo (1,5g/kg), podendo indicar uma possível toxicidade hepática.

Melo et al. (2018) testaram o potencial genotóxico e antigenotóxico do óleo extraído das sementes de *C. guianensis* e relataram que, apesar da grande quantidade de ácido palmítico na amostra, não foi observada qualquer evidência de genotoxicidade na dose de 2.000 mg/Kg. Os mesmos ainda citaram a ausência de mortalidade, sinais de toxicidade e mutagenicidade nos animais testados.

Milhomem-Paixão et al., (2017), encontraram resultados similares em camundongos, que receberam o óleo por via oral. Concluíram que, para as condições experimentais utilizadas (0,5, 1,0 e 2,0 g/kg/dia por 14 dias), o óleo de andiroba não foi hematotóxico, genotóxico, mutagênico ou citotóxico.

Costa-Silva et al., (2007) investigaram os efeitos do óleo de *C. guianensis* nas variáveis reprodutivas e no desenvolvimento da prole de ratas *Wistar*. Nas fêmeas tratadas com óleo, não foram observadas alterações nas variáveis reprodutivas, nos sinais clínicos de toxicidade materna como sangramento vaginais, diarreia ou redução no consumo de ração, nem morte.

Lemes et al., (2017) avaliaram o potencial antigenotóxico de diferentes concentrações de óleo de *C. guianensis* em células de medula óssea de camundongos e não identificaram sinais de citotóxicidade e nem genotóxicidade na medula óssea dos camundongos nas dosagens testadas (250, 500 e 1.000 mg/kg).

Milhomem-Paixão et al., (2017), realizaram um comparativo para testar a citotoxicidade da nanoemulsão e do óleo natural de andiroba *in vitro* (fibroblastos) e *in vivo* (camundongos suíços). Nas condições experimentais *in vivo* (0,5, 1,0 e 2,0 g/kg/dia por 14 dias), não foram encontrados efeitos genotóxicos, citotóxicos ou mutagênicos, enquanto nos testes *in vitro* apresentou citotoxicidade nas maiores concentrações. Os autores atribuíram essa diferença às formas de absorção, pois no estudo *in vitro* não há barreira para a absorção dos compostos pelas células, enquanto *in vivo* o processo é complexo, envolvendo a interação dos compostos com o trato gastrointestinal, transporte para os órgãos, passagem hepático e outros eventos. Esse processo pode ter impedido ou dificultado a entrega dos compostos da andiroba às células do sangue.

Wanzeler et al., (2018) investigaram a atividade do óleo *C. guianensis* no tratamento da mucosite oral em hamsters sírios dourados e concluíram que os tratamentos com óleo (10%, natural a 100% e refinado 10%) não geraram citotoxicidade na medula óssea dos hamsters. No entanto, o uso deste óleo na concentração de 100% por 15 dias consecutivos demonstrou potencial genotóxico.

O perfil lipídico do óleo original (natural) extraído das sementes e o perfil do óleo produzido após a fermentação das sementes devem ser comparados para determinar se existem diferenças significativas. Esse pode ser um fator que causa variabilidade dos resultados além do as concentrações utilizadas e da forma de aplicação. Desta forma, ensaios toxicológicos, de genotoxicidade e análises químicas são necessários para avaliar a segurança de produtos oriundos das amêndoas da andiroba usados pela população (MILHOMEM-PAIXÃO et al., 2017).

2.3.2. Estudos toxicológicos relacionado à Copaíba

Embora os estudos toxicológicos com óleorresina de copaíba sejam considerados escassos, torna-se necessário a pesquisa por vários métodos para se ter conhecimento da composição química e a atividade biológica deste produto e a liberação deste para o uso como fitoterápico (GOMES et al., 2007; MAISTRO et al., 2005)

Conforme já descrito na literatura, a copaíba é um produto natural rico em sesquiterpenos e diterpenos, o que lhe confere uma característica de óleo e resina ao produto extraído do caule de suas árvores. Seus metabólitos secundários possuem propriedades farmacológicas, e também podem ser citotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos (MAISTRO et al., 2005).

Assim, a toxicidade oral aguda da *Copaifera reticulata* foi descrita por Sachetti et al., (2009) conforme o Guia OECD-423/2001 e sua possível ação neurotóxica foi investigada pelos métodos de Campo Aberto, pinçamento da cauda, impressão plantar, endireitamento postural e Labirinto em Cruz. Nestes testes foram usados ratos *wistar* que receberam o óleo da copaíba por via oral. A toxicidade oral aguda do óleorresina foi maior que 2.000 mg/kg e não foram evidenciados sinais clínicos de toxicidade nos animais testados durante todos os dias após a administração da droga estudada. Também não foram observados sinais de neurotoxicidade nos animais testados.

Outro trabalho que utilizou o método preconizado pela OECD 423 (2002) com a copaíba foi o de (LIVIAC et al., 2019) que avaliaram a toxicidade oral aguda do extrato etanólico do óleorresina da copaíba. Neste caso a espécie estudada foi a *Copaifera paupera*, que mostrou o primeiro relato bibliográfico no que se refere a toxicidade do óleorresina desta árvore. Como observado no trabalho, o tratamento com 2.000 mg/Kg não produziu mortalidade ou alteração comportamental no período observado de 14 dias de experimento e ainda não houve variações na perda de peso. Então, observou-se que sua DL50 está acima da dose avaliada, e classificada com baixo risco de toxicidade.

Para determinar a DL50 da copaíba e sua toxicidade, Gomes et al. (2007) estudaram dois tipos de copaíbas, *Copaifera multijuga* e a *Copaifera reticulata*, em camundongos. Nos animais tratados por 5 dias com 500mg/Kg das copaíbas, não foram observadas alterações que fossem caracterizadas como sinais de toxicidade.

Como resultado da DL50, ficou determinado os valores de 3,9 e 4,3 g/kg para *Copaifera reticulata* e *Copaifera multijuga*.

Almeida Júnior et al. (2021) pesquisaram o óleorresina de *Copaifera reticulata* numa composição química não usual coletada na Floresta Nacional do Tapajós, Km 67 da Rodovia BR 163, município de Belterra, Pará. No teste realizado conforme o protocolo número 423 da OECD (2001), ficou determinado que o produto natural em estudo possui uma boa margem de segurança biológica para uso, visto que sua DL50 ficou para uma dose acima de 2.000 mg/Kg, classificando o exsudato natural como Categoria 5.

Maistro et al., (2005) avaliaram o potencial mutagênico e citotóxico mediante estudo de micronúcleo em sangue periférico e analisando aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos *Wistar* tratados com óleorresina de *Copaifera duckei* Dwyer com 10%, 25% ou 50% da DL50 (7,467 mg/kg de peso corporal) por 3 dias consecutivos. Diante dos estudos apresentados, o óleorresina de copaíba estudada apresentou efeitos citotóxicos somente em altas doses, porém não foi capaz de induzir um aumento de aberrações cromossômicas nas células da medula óssea ou no número médio de reticulócitos micronucleado do sangue periférico de ratos *Wistar* in vivo. Sendo assim, as informações colhidas durante o experimento sobre a avaliação do potencial mutagênico da oleorresina de copaíba nas diferentes espécies de roedores mostraram que, apesar de algumas diferenças qualitativas entre as oleorresinas de *Copaifera* estudadas, o padrão tóxico foi semelhante, com efeitos citotóxicos e alguns genotóxicos ocorrendo apenas em altas doses.

Para investigação do caráter genotóxico ou anti-genotóxico de produtos químicos ou outras substâncias como plantas medicinais, são indicados os testes de aberrações cromossômicas, de micronúcleos e o ensaio cometa. Estes são muito utilizados devido sua alta sensibilidade, fácil reprodutibilidade e por produzirem resultados considerados de grande relevância no contexto humano. No entanto, a identificação de possíveis agentes antígenotóxicos torna-se importante para a avaliação risco/benefício de seu potencial uso em mamíferos (LIVIA ET AL., 2019).

Liviak et al. (2019), além do estudo da toxicidade oral aguda que foi citado acima, realizaram o teste de Micronúcleo e o ensaio cometa do extrato etanólico, da *C. paupera* a fim de avaliar o potencial protetor contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida através da medição da capacidade redutora de danos observados nos

referidos métodos. Os animais receberam as drogas por gavagem diariamente no decorrer de 11 dias, com diferentes doses de extrato vegetal (180, 360, 720 e 1.440 mg/kg). Uma hora antes da 11ª dose droga em estudo, ciclofosfamida (50 mg/kg) foi administrada administrado intraperitonealmente em cada animal como controle químico positivo em testes de toxicidade genética in vivo por induzir mutações letais dominantes, micronúcleos, danos no DNA e geração de radicais livres. Com isso, os pesquisadores demonstraram que a copaíba estudada possui efeito citoprotetor por reparar os danos no DNA.

2.3.3. Estudos toxicológicos relacionado ao Jucá

Em uma adaptação da metodologia proposta pela Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Kobayashi et al. (2015) administraram por gavagem 5.000 mg/Kg do extrato de *Libidibia ferrea* nos animais em estudo e monitorou os animais quanto a quaisquer alterações clínicas que indicassem intoxicações no decorrer dos 14 dias após a administração da droga. Observaram que o jucá apresentou boa segurança para ensaios farmacológicos e apresentou baixo potencial tóxico para ratos na dose administrada, classificando-o como Categoria 5 pelo Globally Harmonised System – GHS, que corresponde a alto nível de segurança biológica (OECD, 2002).

Cavalheiro et al. (2009), realizou o teste de toxicidade aguda com o extrato aquoso bruto da *L. ferrea* administrado intraperitonealmente na dose de 0,3 mL.10g⁻¹ de peso corpóreo do produto vegetal. Diante desse estudo, os pesquisadores analisaram que com a dose avaliada, os animais não apresentaram morte ou alteração que fosse caracterizado como sinais toxicológicos, como perda de peso, alterações comportamentais, diarreia ou quaisquer outras alterações, incluindo hemólise das hemácias de ratos e coelhos.

As plantas contêm muitos compostos ativos que são provavelmente responsáveis por suas ações farmacológicas. No entanto, esses compostos também podem exercer um efeito tóxico no desenvolvimento ou funcionamento normal do sistema reprodutivo. Diante do exposto, os testes toxicológicos reprodutivos são projetados para avaliar a toxicidade dos compostos e identificar quais alvos no sistema reprodutivo são afetados pelos metabólitos secundários constituintes do produto natural. Essas substâncias são capazes de reduzir o potencial de fertilidade masculina

ao prejudicar a produção, maturação, função e sobrevivência do esperma, agindo diretamente no espermatozoide, no meio testicular, a função epididimal ou até afetar o trato genital feminino (LUCINDA et al., 2010).

Supondo que a vesícula seminal seja um possível órgão-alvo no tratamento com o extrato aquoso dos frutos de *L. ferrea*, Lucinda et al., (2010) resolveram investigar a toxicidade reprodutiva em ratos Wistar (300 mg/kg diariamente) submetidos a tratamentos de longa duração (52 e 104 dias) com um extrato aquoso desta planta (via oral) e ainda os efeitos colaterais nos órgãos vitais, sistema reprodutivo e produção de espermatozoides. Neste estudo, os tratamentos não ocasionaram mortes ou alterações na atividade locomotora, piloereção, não alteraram o peso corporal dos animais, o consumo de ração e nem produziram efeitos colaterais indesejáveis nas glândulas pituitárias, nem afetaram os órgãos do aparelho reprodutor ou as glândulas sexuais acessórias, que foram confirmados na mensuração de seus pesos que não foram alterados significativamente. Tais observações foram corroboradas pelos dados histológicos que não mostraram alterações na histoarquitetura do testículo e epidídimo. Nenhum comprometimento do ciclo espermatogênico foi observado, e a concentração de esperma na secreção da cauda do epidídimo direito não diferiu significativamente entre os grupos controle e tratado de ambos os protocolos de teste. A morfologia do esperma não foi afetada pelo tratamento. Assim, no trabalho foi demonstrado que o tratamento com o jucá provoca um funcionamento normal do sistema reprodutor e seu sistema endócrino relacionado.

Em outro estudo, Peters et al. (2008) avaliaram a toxicidade reprodutiva de extratos aquosos de frutos de *L. ferrea* em ratas. O extrato foi administrado por gavagem (300 mg/kg de peso corporal) em ratas no quinto, sexto e sétimo dia da gestação, que corresponde ao período de implantação do blastocisto. Não se observaram sinais de toxicidade materna indireta, como alteração da atividade locomotora, sangramento vaginal, diarreia, piloereção e óbitos. O peso corporal e o peso dos ovários, rins e fígado maternos não diferiram entre os grupos experimentais. A alimentação e a ingestão de água foram semelhantes entre os animais controle e tratados. O número de corpos lúteos, fetos vivos, reabsorções, implantes do blastocisto, bem como a porcentagem de perdas pré e pós-implantação, foram semelhantes nos ratos controle e tratados. Como não foram observadas diferenças significativas na placenta e no peso corporal fetal, pode-se presumir que não houve

toxicidade embrionária. Assim, os autores concluíram que a droga estudada pareceu não ser tóxica à mãe e nem ao feto.

Em estudo publicado por Souza et al. (2006), foi avaliado o potencial clastogênico e citotóxico do extrato bruto aquoso de frutos de *L. ferrea* em células da medula óssea de rato *Wistar* utilizando a avaliação do teste do micronúcleo e aberração cromossômica em animais tratados com 500, 1000 e 1500 mg/kg do extrato e com 30 mg/kg ciclofosfamida, ambos por via oral. Essas doses foram escolhidas com base na DL50 do jucá, que foi determinada em 2.200 mg/kg. As células da medula óssea foram coletadas 24 horas após o tratamento. Como resultados alcançados, não foram evidenciadas diferenças no número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados, no número médio de aberrações cromossômicas ou índice mitótico para as três concentrações testadas, sempre levando em consideração referencial o grupo controle negativo. Isso leva a crer que o extrato aquoso bruto dos frutos de *L. ferrea* não apresentam efeito clastogênico e nem citotóxico em células da medula óssea de ratos *Wistar*.

Oliveira et al. (2021) avaliaram a atividade hemolítica e a viabilidade celular da linhagem MRC-5, obtidas a partir de fibroblastos de pulmão fetal, de uma formulação de pomada oralbase com jucá para uso em úlceras traumáticas. Eles utilizaram como material vegetal a casca do caule e a vagem de *L. ferrea* e o método de estudo da viabilidade celular escolhido foi o de azul de alamar e o teste de hemólise. Diante dos resultados alcançado, os autores puderam observar que a formulação em oralbase proposta de *Libidibia ferrea* e o seu extrato, assim como o seu veículo e adjuvantes não apresentaram sinais citotóxicos quando em contato com hemácias e fibroblastos em cultura de células, correspondendo à 100% de viabilidade celular para a pomada que estava em estudo na dose de 0,78 até 50 µg/mL do extrato.

Bacchi & Sertie (1994) demonstraram em ratos que o tratamento alternado a cada 48 horas por 30 dias com extrato hidroalcólico 70% seco do caule de *L. ferrea* (400 mg/kg, v.o.) não induziu nenhum sinal de toxicidade em ratos, sobre a massa corporal, consumos de água e ração ou o peso relativo e absoluto dos tecidos. Os roedores também não apresentaram diarreia, piloereção, motilidade, qualquer estereotipia, convulsão e sonolência. Macroscopicamente, neste estudo não foram visualizadas alterações no Fígado, baço, rins e pulmões. Na dose usual não foi evidenciado a variação do pH gástrico.

Vasconcelos et al. (2020) avaliaram a toxicidade e segurança em dose repetidas no decorrer de 12 semanas do extrato aquoso da casca do caule de *Libidibia ferrea* (300 e 1500 mg/ kg pc/dia via oral) com camundongos Swiss. Como resultados obtidos, os pesquisadores observaram que os animais não apresentaram alterações comportamentais e físicas ou mortalidade. No entanto, foram evidenciados perda de massa corporal, quando tratados com o extrato. Diante do exposto, os estudiosos correlacionaram esse efeito à presença de polifenóis (taninos) que está associada a perda de massa corporal de animais e humanos.

Ao analisar externamente os tecidos coração, rim, pulmão, fígado, estômago, intestino, pâncreas, testículo e epidídimo dos animais tratados, não foram evidenciadas alterações significativas no peso, cor ou textura. Vale lembrar que na dose 1500 mg/kg dia, ocorreu uma diminuição da massa da vesícula seminal e do ducto deferente e um aumento relativo no peso do estômago, intestino delgado, testículo e provocou um aumento acentuado de 39,7% no nível de lactato desidrogenase (LDH). Não foram observadas diferenças estatísticas nos níveis séricos de glicose, creatinina, bilirrubinas total, direta e indireta, triglicerídeos, colesterol total, ácido úrico e alanina aminotransferase (ALT) nos dois grupos tratados com a droga em estudo. Entretanto, apresentaram uma diminuição nos níveis de proteínas totais e albumina e um aumento importante na aspartato aminotransferase (AST) e amilase (VASCONCELOS et al., 2020).

Microscopicamente, todos os órgãos avaliados mostraram aspectos homogêneo, exceto o rim que apresentou leve infiltrado de leucócitos e o intestino que tinha um infiltrado de leucócitos intraepitelial e áreas de necrose. Na avaliação qualitativa e quantitativa das hemácias, demonstrou não serem afetadas pelo tratamento com *L. ferrea*. Diferentemente aconteceu com os leucócitos que teve um aumento nos neutrófilos que diminuíram. Sendo assim, os pesquisadores associaram tal achado na série leucocitária a uma indicação de que a demanda por leucócitos é superior à sua produção. Esses resultados foram coerentes com os observados na histopatologia e bioquímica (VASCONCELOS et al., 2020).

2.4. Atividade farmacológica das plantas medicinais

Desde os tempos primórdios os homens confiam nas plantas para satisfazer muitas de suas necessidades primárias com o intuito de alcance terapêutico (SOUZA

et al., 2022). Efeitos terapêuticos como analgésicos, antipiréticos, cicatrizante, antimicrobiano, antiinflamatório, entre outros, são algumas das atividades atribuídas a estes vegetais (ALVES, 2013; J. C. T. CARVALHO, 2004; PECKOLT & PECKOLT, 2016).

2.4.1. Atividade antimicrobiana das Plantas Medicinais

Segundo Heck et al. (2017), algumas plantas medicinais apresentam em sua composição química uma grande variedade de constituintes. No entanto, os princípios ativos são substâncias químicas encontradas em maiores concentrações em plantas que vão atuar como medicinais, provocando reações no organismo que as utiliza. Esses compostos são sintetizados a partir da luz e dos nutrientes que a planta recebe ou consegue extrair do solo.

Por meio de pesquisas *in vitro* com plantas medicinais, investigou-se determinadas atividades antifúngicas e antibacterianas de produtos oriundos da flora, como os extratos vegetais, óleos essenciais e compostos isolados, como os alcalóides, polifenóis, taninos e terpenos. As substâncias decorrentes do metabolismo secundário das plantas medicinais podem apresentar ações biológicas contra fungos e bactérias por meio da inibição enzimática, privação de substrato, ruptura de membrana e complexação de íons metálicos como ocorre com os polifenóis e taninos, por ruptura da membrana como acontece com os terpenos e óleos essenciais, e a intercalação na parede celular bacteriana produzida pelos alcalóides (OLIVEIRA M. C. B. et al. (2020).

Sendo assim, o interesse em plantas medicinais cresceu bastante, fazendo com que indústrias farmacêuticas e institutos de pesquisa tenham as plantas como alvo na busca por novos fármacos sendo utilizadas para o controle alternativo de doenças em seres humanos (BRUNING; MOSEGUI; VIANNA, 2012).

Logo, mais pesquisas avaliando o uso das plantas como fonte de agentes antimicrobianos devem ser estimuladas, principalmente visando à obtenção de produtos vegetais para controle microbiano. Além da atividade antimicrobiana direta, alguns estudos têm também investigado a atividade moduladora da resistência microbiana aos antibióticos por produtos derivados de plantas, com o objetivo de aumentar a eficácia de tais fármacos no tratamento de infecções ocasionadas por microrganismos multirresistentes (SILVA et al., 2022).

Vale lembrar que muitas pessoas utilizam cotidianamente antibióticos e o seu uso em excesso ou de forma inadequada, é o principal fator da rápida disseminação de cepas resistentes. Assim, as plantas medicinais se torna um fonte promissora de novas moléculas ativas, mais eficazes e seguras contra os microorganismos (OLIVEIRA M. C. B. et al., 2020).

A resistência microbiana a diversos fármacos e a falta de alternativas terapêuticas eficazes para o tratamento das infecções são fatores preocupantes e um dos maiores desafios da saúde pública mundial. Por isso, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de isolar e purificar substâncias de origem natural, com atividade antimicrobiana mais efetiva, menos tóxica e com diferentes mecanismos de ação. Neste sentido, estudos que visem a descoberta de novas substâncias bioativas provenientes de fungos amazônicos se mostram bastante promissores, pois a biodiversidade microbiológica da região é grande e pouco explorada, o que aumenta a probabilidade da descoberta de novos compostos de interesse biotecnológico (PAPHITOU, 2013).

Para compreender a resistência bacteriana, os profissionais de saúde são capazes de contribuir, de forma eficaz, na reformulação das políticas públicas de saúde e na prática clínica convencional. No qual o uso de plantas medicinais se mostra uma excelente opção no tratamento e prevenção de doenças, com baixo custo e acessibilidade à população. Ainda que a maioria dos vegetais presentes na biodiversidade do país não estejam presentes nos códigos oficiais, há uma infinidade de antibióticos em potencial a serem descobertos e/ou desenvolvidos, no qual novas ferramentas desenvolvidas com intuito de promover a eficácia das plantas medicinais e seus metabólitos como alternativa terapêutica no tratamento de microorganismos multirresistentes (SILVA L. O. P. & NOGUEIRA, 2021).

2.4.1.1. Atividade antimicrobiana da Andiroba (*C. guianensis*)

Os ácidos graxos têm ações antimicrobianas sob uma variedade de organismos, incluindo bactérias, fungos e uma variedade de parasitas (DAS, 2018). Huang et al. (2011) mencionaram que os ácidos: linoleico, oleico (OA), entre outros, apresentaram atividades antimicrobianas contra vários microorganismos orais, incluindo *S. mutans* (ATCC 25175), *A. actinomycetemcomitans* JP2, *C. albicans*

(ATCC 2091), *P. gingivalis* (ATCC 33277), *F. nucleatum* (ATCC 25586) e *S. gordonii* (ATCC 10558).

O ácido oleico também pode ser usado terapeuticamente sozinho ou em combinação com antibióticos para tratar eficazmente infecções por *P. aeruginosa* (ATCC 27853) (SELVADOSS et al., 2017). Também foi registrado que o ácido linolênico pode matar rapidamente *Staphylococcus aureus* (DAS, 2018). Outros estudos também relatam a ação antimicrobiana do ácido palmítico, o que implica que os ácidos graxos livres de ocorrência natural podem ter um papel terapêutico (AWANG-JAMIL et al., 2019; DAS, 2018; HUANG et al., 2011).

A ação antimicrobiana do óleo de andiroba, também tem sido relacionada à presença de limonóides, que são tetranortriterpenóides altamente oxigenados que possuem uma ampla gama de atividades biológicas, como antibacteriano e antifúngico e que estão presentes no óleo da andiroba e no resíduo deste produto. Estes metabólitos secundários ocorrem com frequência em espécies da família Meliaceae e Rutaceae, sendo identificados até hoje mais de 300 tipos (ROY; SARAF, 2006; TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2013).

Diante das propriedades químicas do óleo de andiroba, foram realizados alguns ensaios para avaliar seu potencial biológico. Carmona et al. (2013) avaliaram os efeitos do óleo de *C. guianensis* no tratamento de periodontite induzida em ratos, uma doença inflamatória crônica bucal. Os autores ainda sugerem que se administrada topicamente ou dentro de dentifrícios dentários provavelmente levaria a melhores resultados por ter propriedade antibacteriana. Souza R. L. de et al. (2019) também registraram a ação antifúngica do óleo de *C. guianensis*.

Conde et al. (2015) realizaram avaliaram a ação de espécies amazônicas quanto à sua ação antimicrobiana contra microrganismos formadores de biofilme dental, dentre eles a andiroba. Os resultados mostraram que o óleo de *C. guianensis* apresenta características que promovem ação antiinflamatória, entretanto não apresentou atividade antimicrobiana contra *Streptococcus sobrinus* (ATCC 27609), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 9811), *Streptococcus sanguis* (ATCC 10556); *Lactobacillus casei* (ATCC 7469).

Packer & Da Luz (2007) também não observaram atividade microbiana do óleo de andiroba em cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e *Candida albicans* (ATCC

10231), assim como Bandeira et al. (2005) com cepas de *Candida*, *Streptococcus* e *Staphylococcus* de interesse médico e odontológico. Souza B. A. A et al. (2017), em avaliação da cicatrização em ratos Wistar diabéticos, relataram que o óleo de *C. guianensis* não inibiu o crescimento de microrganismos associados a infecções de feridas, que sua atividade de cicatrização é independente de sua atividade antimicrobiana.

Menezes et al. (2009) avaliaram a atividade antifúngica de óleos e extratos vegetais dentre eles o de *C. guianensis* (*in natura* em diluições de 32, 16, 8, 4 e 2%), frente à cepa padrão de *Candida albicans* (ATCC 90028). No estudo, nenhum dos óleos testados apresentou atividade antifúngica, porém, os autores destacam que fatores como a técnica utilizada, o meio de crescimento, o material botânico, a colheita, o método de extração e as variações genéticas de uma mesma espécie vegetal podem alterar o teor de princípio ativo presente no óleo, afetando sua eficácia. Rocha A. A. et al. (2020) também atribuíram os resultados ineficientes do óleo no combate ao fungo *Malassezia pachydermatis* as variações experimentais, principalmente a dose utilizada (100mg/L).

Diante destas variações, estudos para a determinação da concentração inibitória mínima dos óleos e extratos de propriedades antimicrobianas, são importantes para permitir o uso desses no tratamento das infecções fúngicas e bacterianas com eficácia, custos baixos e menores efeitos colaterais (Menezes et al., 2009).

Apesar da presença de compostos com propriedades biológicas da *C. guianensis*, os estudos apresentam grande diversidade de resultados. Deste modo, pesquisas envolvendo o uso do óleo desta espécie contra fungos e bactérias podem ajudar a avaliar sua eficácia e elucidar os fatores que a influenciam.

2.4.1.2. Atividade antimicrobiana da Copaíba (*C. reticulata*)

Considerando as diversas informações existentes no âmbito etnofarmacológico e científico, muitos estudos têm sido direcionados à investigação do potencial antimicrobiano do óleoresina da copaíba contra diversos microrganismos, sobretudo os patogênicos ao ser humano (MENDONÇA & ONOFRE, 2009). Para Tobouti et al. (2017), a atividade antibacteriana do óleo de copaíba parece estar relacionada à combinação de terpenóides que afetam a estrutura da parede celular bacteriana, fato

este já comprovado em muitos microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e, principalmente, gram-positivas, como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.

Ziech et al. (2013) estudaram o efeito antibacteriano do óleorresina da *Copaifera reticulata*, da Floresta Nacional do Tapajós, localizada em Belterra (Pará), frente a 26 *Staphylococcus* coagulase positiva isolados de casos de otite em cães. Neste estudo foi possível observar pelo método de microdiluição de caldo em placas conseguiram inibir o crescimento bacteriano em 50% dos isolados a partir de 0,082 mg/mL do oleorresina de copaíba, enquanto que a concentração bactericida mínima foi de 0,328 mg/mL. A concentração inibitória mínima (CIM) com ação em 90% da população de microrganismos aconteceu em 0,164mg/mL, enquanto a concentração bactericida mínima em 90% ocorreu em 1,31mg/mL.

No estudo realizado por Santos D. G. et al., (2020b), o efeito antibacteriano do óleorresina de *C. reticulata* (Mojú-Pará) e frações 0,1 g/mL foi investigado frente as bactérias gram-negativas *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (ATCC-14028), *Escherichia coli* (ATCC-43895) e gram-positivas *Listeria monocytogenes* (ATCC-15313) e *Staphylococcus aureus* (ATCC-6538), que são usualmente envolvidas com surtos causados pela ingestão de alimentos contaminados. Desta forma, observou-se que óleorresina e as frações com hidrocarbonetos sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos inibiram o crescimento bacteriano somente da cepa de *S. aureus*.

Várias são as evidências de que os principais agentes etiológicos das doenças periodontais são bastonetes Gram-negativos. Em busca de avaliar a ação antimicrobiana contra vários patógenos orais, Bardají et al. (2016) investigaram a atividade antimicrobiana do oleorresina de *C. reticulata* contra alguns microrganismos que causam cárie dentária e periodontite, como: *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33563), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 29741) e ainda os isolados clínicos de *Streptococcus sanguinis*, *Lactobacillus casei*, *Streptococcus salivarius*, *Enterococcus faecalis*, *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Actinomyces viscosus* e *Prevotella buccae*. As concentrações de estudo

foram de 0.195 até 400 µg/mL e os valores da (CIM) acima da dose máxima do estudo corresponderam a ausência de ação antibacteriana.

Como resultado alcançado, Bardají et al. (2016) observaram que o oleorresina de *C. reticulata* não apresentou atividade antibacteriana frente à *L. casei* (ATCC 11578) e os isolados clínicos, *Actinomyces viscosus*, *Prevotella buccae*, *P. gingivalis* e *Prevotella intermedia*. Para os outros microrganismos testados, os resultados mostraram-se promissores, pois a atividade antibacteriana foi em concentrações iguais ou inferiores a 100 µg/mL. Sendo assim, os resultados obtidos sugerem que o produto vegetal estudado poderá compor um enxaguatório bucal uma vez que essa oleorresina interfere diretamente na interação entre os microrganismos, impedindo a formação de placas dentárias. Essa associação pode minimizar os efeitos colaterais dos produtos para lavagem bucal e melhorar sua ação antimicrobiana, antiinflamatórias e, imunomodulatórias, mediante efeito sinérgico no tratamento da periodontite. Tal efeito farmacológico pode ser atribuído aos diterpenos ácido ent-copálico, éster ent-agático-15-metílico e ácido ent-polialítico que interage com a membrana celular da bactéria e aumenta a permeabilidade, se ligando a constituintes vitais aos patógenos e também alterando o pH bacteriano.

Mendonça & Onofre (2009) estudaram atividade antimicrobiana *in vitro* do óleorresina de *Copaifera multijuga* (Aripuanã, MT) pela técnica de difusão em disco com culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027). Os resultados demonstraram que o óleorresina teve uma ação terapêutica estabelecida conforme o aumento da concentração da droga, sendo que nas concentrações de 1,56% a 100% houve inibição do crescimento dos patógenos avaliados.

Um estudo realizado por Pieri et al., (2012), teve como objetivo avaliar a atividade inibitória do óleorresina de *C. langsdorffii* e *C. officinalis* contra bactérias patogênicas de humanos e animais. O método utilizado foi o de difusão em ágar e os organismos avaliados foram as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 8095, 12598, 14458, 29213), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (CDC 305), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Shigella flexneri* (NCDC 9989), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) e os isolados clínicos de *Actinobacillus pleuropneumoniae* e *Haemophilus parasuis*. Como resultados os óleos em estudo conseguiram inibir o crescimento das três cepas Gram-negativa (*E. coli*, *P.*

aeruginosa e *S. flexner*) e também de todas as cepas testadas de *S. aureus*. Quanto ao efeito frente às bactérias *A. pleuropneumoniae*, *C. freundii* e *H. parasuis*, os óleos testados mostraram incapacidade de inibir o crescimento das mesmas.

Em busca de produtos naturais com propriedades antibacterianas, Simões et al. (2016) relataram boa atividade terapêutica do óleorresina de *Copaifera multijuga* aplicado sob a forma farmacêutica de gel do óleo de copaíba no biofilme dental. Os microrganismos estudados foram *S. mitis*, *S. constellatus* e *S. salivarius* isolados da cavidade oral de pacientes e contra cepas de *S. mitis* (ATCC903), *S. mutans* (ATCC10449), *S. sanguinis* (ATCC15300) e *S. oralis* (ATCC10557). No estudo realizado por Guimarães et al. (2016), o óleorresina de *Copaifera officinalis* produziu efeito antibacteriano contra cepa de *S. aureus* em uma concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima de 0,3125 mg/mL para ambas.

Para avaliar o efeito antifúngico dos oleorresinas das copaibeiras, Deus et al., (2011) testaram o óleo essencial e o óleorresina bruto da *Copaifera multijuga* Hayne, coletada em Santarém, Pará. No ensaio, foram utilizadas as cepas: *Aspergillus qflavus* (IOC-3974), *Aspergillus niger* (IOC-200), *Aspergillus tamaris* (IOC-186), *Aspergillus tamaris* (IOC-187), *Aspergillus terreus* (IOC-217), *Candida guilliermondii* (IOC-2889), *Candida tropicalis* (IOC-3610) e *Candida parapsilosis* (IOC-2882). A partir dos resultados, foi possível observar um halo de inibição tanto para o óleo essencial, que variou de 9,0 à 19,5 mm, quanto para o óleorresina, que produziu halo de inibição de 7,0 à 11,0 mm nas placas ao redor dos discos no semeio de todos os microrganismos. Conforme apresentado, o óleo essencial demonstrou melhor resultado, uma vez que, apresentou maior halo de inibição em todos os microrganismos testados e esta ação farmacológica pode ser atribuída à presença dos metabólitos: α -copaeno, β -cariofileno, trans- α -bergamoteno, α -humuleno, γ -muuroleno e β -bisaboleno. Estes resultados mostram que novos estudos devem ser realizados com o óleo essencial de *Copaifera multijuga* Hayne, com a finalidade de obter um possível produto para combater a aspergilose e candidíase.

2.4.1.3. Atividade antimicrobiana do Jucá (*L. ferrea*)

Muitos são os estudos atribuído a atividade antimicrobiana do jucá contra diversas bactérias. Assim, alguns autores resolveram estudar essa ação farmacológica muito difundida popularmente (AMÉRICO et al., 2020; GUILHON-

SIMPLICIO et al., 2015). Essa propriedade é atribuída aos metabólitos secundários presentes no produto vegetal, como taninos, flavonoides e alcaloides, que são produzidos em função de uma infecção bacteriana neste vegetal e que podem alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática dos patógenos, facilitando a absorção das drogas (ALENCAR FERREIRA ET AL., 2016).

No estudo realizado por Américo et al. (2020), a atividade antimicrobiana *in vitro* do jucá extrato liofilizado do jucá (*Libidibia ferrea*) foi determinada pelo método de microdiluição em placa, em concentrações entre 1.000 e 15,625 µg/ml tendo sido também realizado a determinação da concentração inibitória mínima. Nos experimentos foram testados o jucá contra as bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC14458), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 19429), e ainda o fungo *Candida krusei* (ATCC 6258). O extrato etanólico de jucá apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (250 µg/ml), *E. coli* (125 µg/ml), *P. aeruginosa* (15,625 µg/ml) e *C. krusei* (15,625 µg/ml). Já a atividade fungicida foi evidenciada em *C. krusei* com 15,625 µg/ml, e antimicrobiana em *P. aeruginosa* à 1.000 µg/ml. Segundo os autores, tais propriedades farmacológicas estão relacionadas à presença de taninos e flavonoides, que possuem propriedades antimicrobianas devido à inibição de enzimas, modificando o metabolismo nas membranas microbianas e diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (AMÉRICO et al., 2020).

Ferreira et al. (2016) testaram o efeito antibacteriano dos extratos, da vagem e da entrecasca da árvore de jucá contra as cepas bacterianas de *S. aureus* (ATCC 25293), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e ainda as espécies multirresistentes de *S. aureus* (SA10), *E. coli* (EC06) e *P. aeruginosa* (PA32). Diante dos resultados alcançados, observaram que os extratos etanólico da casca e das vagens de *C. ferrea* apresentaram valores de CIM de 1024 µg/ml para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), bem como *S. aureus* multirresistente (SA10), *E. coli* (EC06) e *P. aeruginosa* (PA 32). O extrato etanólico da vagem de *L. ferrea* contra *S. aureus* mostrou efeito potencializador de outros antimicrobianos consagrados como a clindamicina, demonstrando um efeito sinérgico (FERREIRA et al, 2016). O extrato etanólico da entrecasca da planta estudada, combinado com

aminoglicosídeos como a amicacina e gentamicina, também apresentou sinergismo contra a SA10, PA32 e EC06 (FERREIRA et al., 2016).

A atividade antibacteriana do extrato hidrometanólico das vagens de *L. ferrea* (500 mg/mL) foi avaliada por Veloso et al. (2020), quais avaliaram a atividade biológica do vegetal contra bactérias orais comumente associadas ao mau hálito, como a Gram-negativa *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* e as Gram-positivas *Parvimonas micra*, que são capazes de produzir compostos voláteis de enxofre (VSC). Como resultados alcançados para o produto em estudo, ficou determinado a Concentração Inibitória Mínima de 50 µg/mL e a Concentração Bactericida Mínima (CBM) >50 µg/mL para *Parvimonas micra*, enquanto o microrganismo *Porphyromonas gingivalis* obteve CIM de 120 µg/mL e CBM de 130 µg/mL, *F. nucleatum* CIM e CBM de 400 µg/mL, e *P. intermedia* com CIM e CBM acima de 400 µg/mL.

Outro trabalho que avaliou a atividade antibacteriana e antifúngica do jucá foi o de Cavalheiro et al. (2009) que testou a eficiência do extrato bruto das sementes de *C. ferrea* as bactérias Gram-positivas, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), e Gram-negativas, *Enterobacter aerogens* (ATCC 13048), *Salmonella choleraensis* (ATCC 10708), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25619) e os fungos *Aspergillus niger*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *C. truncatum*, *Fusarium oxysporum*, *F. Solani*, *F. pallidoroseum*, *Mucor sp.*, *Neurospora sp.*, *Penicillium herguei*, *Phomopsis sp.*, *Phytium oligandrum*, *Rhizoctonia solani* e *Thricoderma viridae*. Para a atividade antimicrobiana, os autores usaram Discos de papel de filtro com 15 µL do extrato bruto estéril e para atividade antifúngica 300 µL. Como resultados observaram que na dose testada do extrato bruto das sementes da *L. ferrea*, não houve inibição do crescimento de nenhuma das cepas bacterianas e dos fungos analisados.

Os produtos naturais têm sido avaliados de forma isolada ou conjugada com outros vegetais em busca de novas substâncias que possam neutralizar mecanismos de resistência em leveduras do gênero *Candida*. No entanto, a multirresistência antifúngica que vem sendo relatada em vários países, principalmente para espécies não *C. albicans*, tem levado cientistas a determinar padrões de suscetibilidade desse patógeno aos antifúngicos convencionais com o objetivo de garantir a estratégia terapêutica mais eficaz (SOARES M. R. P. S. et al., 2018).

Sendo assim, em busca dessas alternativas, Soares M. R. P. S. et al. (2018) optaram por avaliar a atividade fungicida de algumas espécies de plantas medicinais adquiridas na feira do Ver-o-peso em Belém (Pará-Brasil), dentre elas as sementes de jucá. Cepas de fungos causadores de candidíase orofaríngea, como *C. albicans* (ATCC 10231), *C. glabrata* Collection of Tropical Cultures (CCT 0728), *C. krusei* (CCT 1517), *C. guilliermondii* (CCT 1890) e *C. albicans* (espécie clínica) foram testadas com extrato etanólico liofilizado de Sementes de *L. ferrea*. Como resultados, a *L. ferrea* apresentou efeito antifúngico promissor contra todas as cepas de *C. albicans* e não *albicans*, e ainda demonstraram deformações estruturais em eletromicrografias com todas as cepas testadas (SOARES M. R. P. S. et al., 2018).

Entretanto, Cavalheiro et al. (2009) trabalhou com extratos aquosos de sementes de Jucá, e conseguiram inibir o crescimento de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Fusarium pallidoroseym*, *Mucor sp.*, *Neurospora sp.*, *Penicillium herguei* ou *Phomopsis sp.* (CAVALHEIRO et al., 2009).

2.4.1.4. Mecanismos de ação das drogas antimicrobianas

Antibióticos são compostos naturais ou sintéticos capazes de inibir o crescimento ou causar a morte de fungos ou bactérias. Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos compreendem a maioria dos antibióticos em uso clínico e podem ser classificados em β -lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclina, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Os antibióticos de origem sintética são classificados em sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

As drogas antimicrobianas podem ser classificadas como bactericidas ou bacteriostáticas. Enquanto os fármacos bactericidas atuam, eliminando o micro-organismo diretamente, os bacteriostáticos inibem o crescimento e a multiplicação bacteriana, possibilitando que as defesas imunológicas do hospedeiro eliminem os patógenos. Os agentes antimicrobianos, utilizados para o tratamento de infecções bacterianas, podem ser classificados, também, de acordo com o principal mecanismo de ação. Existem cinco principais modos de atuação: 1) inibição da síntese da parede celular; 2) inibição da síntese de proteínas; 3) desestabilização da membrana da

célula bacteriana; 4) interferência na síntese de ácido nucleico; 5) inibição da síntese de folato (OLIVEIRA et al., 2021c).

A parede celular bacteriana é uma estrutura polissacarídica essencial, que envolve a maioria das bactérias e protege a membrana plasmática de lise osmótica. É constituída na maior parte pelo polímero peptidoglicano (PG), que consiste em cadeias de glicano (carboidratos) com peptídeos complexados. A síntese da parede celular bacteriana envolve uma via metabólica complexa, onde precursores localizados no citoplasma são ligados enzimaticamente antes de serem transportados para a parede externa. Os antibióticos da classe dos β -lactâmicos são os principais agentes antibióticos que agem na inibição da síntese da parede celular bacteriana, essa classe de medicamento age especificamente na enzima transpeptidase, inibindo irreversivelmente a ação desta enzima, que tem como função catalisar a reação de transpeptidação entre as cadeias de peptidoglicano da parede celular bacteriana, a atividade desta enzima leva à formação de ligações cruzadas entre as cadeias peptídicas da estrutura peptidoglicana, que conferem à parede celular uma estrutura rígida importante para a proteção da célula bacteriana contra as variações osmóticas do meio. O maior número de antibióticos β -lactâmicos em uso clínico pertence à classe das cefalosporinas, que estão subdivididas em cefalosporinas de primeira, segunda, terceira e quarta gerações, em função do espectro de ação mais ampliado frente a bactérias Gram negativas (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

Os medicamentos inibidores da síntese proteica têm como mecanismo de ação os ribossomos bacterianos. Os ribossomos bacterianos se diferem dos ribossomos dos mamíferos, pois são compostos de unidades 30S e 50S, enquanto os mamíferos possuem ribossomos citoplasmáticos de unidades 40S e 60S, no entanto os ribossomos de mamíferos e bactérias possuem estruturas semelhantes. Nesse sentido, essa classe de antibióticos de modo geral, se liga a um ribossomo bacteriano específico e inibe irreversivelmente a síntese de proteínas necessárias para o metabolismo e multiplicação bacteriana. Nessa classe de medicamentos estão presentes as tetraciclina (Demecociclina, Doxíciclina, Minociclina e Tetraciclina), glicilciclina (Tigeciclina), aminoglicosídeos (Amicacina, Estreptomicina, Gentamicina e Neomicina), cetolídeos/macrolídeos (Azitromicina, Claritromicina, Eritromicina e Telitromicina), macrocíclicos (Fidaxomicina), lincosamidas (Clindamicina),

oxazolidinonas (Linezolida) e outros (Cloranfenicol) (OLIVEIRA et al., 2021c; WHALEN; FINKEL; PANAVELIL, 2016).

Segundo Goldin et al., (2021) os principais medicamentos desestabilizadores de membrana são o grupo das Polimixinas que são um grupo de antibióticos descobertos na década de 1950, esses compostos são produzidos por várias estirpes de *Paenibacillus polymyxa*, um bastonete aeróbico formador de esporos encontrados no solo, esse bastonete origina um grupo de cinco moléculas intimamente relacionadas, as polimixinas A, B, C, D e E, sendo esta última chamada de colistina, vale ressaltar, que as polimixinas A, C e D não são utilizadas na clínica, devido à sua alta toxicidade. As Polimixinas atuam deslocando competitivamente os íons cálcio e magnésio da membrana celular, levando à ruptura da parede celular de bactérias Gram negativas. Foram menos usadas no passado devido à existência de antibióticos com menos efeitos colaterais. Atualmente, passaram a ser comumente utilizadas por causa da grande resistência bacteriana enfrentada. Outro medicamento que desestabiliza a membrana bacteriana é a daptomicina, esse medicamento é um lipopeptídeo cíclico com mecanismo de ação que envolve, principalmente, a interação com fosfolipídeos da membrana citoplasmática na presença de íons de cálcio, causando extravasamento de íons de potássio para o meio extracelular e destruição da parede celular bacteriana. Também age bloqueando a síntese do ácido lipoteicoico, componente da membrana externa de bactérias Gram-positivas. Além desse medicamento há a Bacitracina, utilizada exclusivamente em aplicações tópicas, inibe a desfosforilação do transportador pirofosfato C55-isoprenil pela fosfatase da membrana citoplasmática bacteriana, inibindo o transporte do peptideoglicanos (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010; SCHERER; BOTONI; COSTA-VAL, 2016)

O DNA-cromossômico é formado por duas cadeias de nucleotídeos em espiral, as quais se encontram enroladas de modo fortemente apertado, a fim de ocuparem o menor espaço na célula. Este superespiralamento do DNA é controlado por ação de uma enzima, a DNA-girase (ou topoisomerase II). Por ocasião da divisão celular, a DNA-girase provoca uma incisão nas cadeias do DNA-cromossômico, que se separam. Sob a ação de outra enzima, a DNA-polimerase, forma-se uma cadeia de nucleotídeos complementar a cada uma das cadeias antigas, que são ligadas a estas novamente pela ação da DNA-girase, voltando a ocorrer o superespiralamento do

DNA. O superespiralamento e a replicação do DNA-cromossômico são também controlados pela topoisomerase IV, esta última mais especificamente nas bactérias gram-positivas. Existem várias substâncias que atuam na replicação do DNA-cromossômico bacteriano, a maioria também se mostrando tóxica para a célula humana, como é o caso da mitomicina, um antibiótico antineoplásico. Dentre os antimicrobianos, as principais drogas que agem por este mecanismo são as quinolonas. A intimidade do processo não é bem conhecida, sabendo-se que as quinolonas inibem as subunidades A da DNA-girase e as subunidades ParC e ParE da topoisomerase IV; com isto, o DNA tem suas espirais relaxadas, ocupando um espaço maior que o contido na bactéria. Esta ação explica o alongamento anormal das bactérias, que ocorre sob a influência das quinolonas e rompimento da célula bacteriana. Além disso, as incisões expostas nas cadeias do DNA induzem à produção de exonucleases, que podem degradar o cromossomo, com consequente morte celular. Paradoxalmente, as quinolonas, em elevada concentração, têm ação bacteriostática, provavelmente por inibirem a síntese do RNA. Outro medicamento que inibe a síntese de ácidos nucleicos é a rifampicina, que é utilizada clinicamente como parte da combinação de fármacos para o tratamento da tuberculose, ela age ligando-se a subunidade β da RNA polimerase, impedindo a transcrição do RNAm e consequente a síntese de proteínas (OLIVEIRA et al., 2021c; SCHERER; BOTONI; COSTA-VAL, 2016).

Enzimas que precisam de cofatores derivados do folato são essenciais para a síntese de purinas e pirimidinas (precursores de RNA e DNA) e outros compostos necessários para o crescimento e a multiplicação celular. Portanto, na falta de folato, as células não crescem nem se dividem. Porém, várias bactérias são impermeáveis ao ácido fólico e outros folatos e, por isso, dependem da sua capacidade de sintetizar folato próprio. As sulfonamidas (sulfas) são uma família de antimicrobianos que inibem essa síntese de folato. Um segundo tipo de antagonista do folato – a trimetoprima – impede que os microrganismos convertam o ácido di-hidrofólico em ácido tetra-hidrofólico com efeitos mínimos nas células humanas capazes de fazer essa conversão (WHALEN, 2016). Um exemplo de sulfa ainda utilizada na terapêutica é o sulfametoxazol em associação com o trimetoprim para o tratamento de pacientes com infecções no trato urinário e para pacientes portadores do vírus HIV que apresentam infecções por *Pneumocystis carinii*. Desse modo, cada um desses fármacos bloqueia

uma etapa no metabolismo do ácido fólico. O sulfametoxazol bloqueia a enzima di-hidropteroato sintetase, presente apenas nas bactérias, enquanto o trimetoprim inibe a di-hidrofolato redutase. Ambas as enzimas atuam na via de biossíntese do N5 N10-metileno-tetra-hidrofolato, importante cofator que fornece uma unidade de carbono na biossíntese de bases pirimidínicas constituintes dos ácidos nucleicos. A atuação destes fármacos é sinérgica no bloqueio de dois diferentes passos na via bioquímica de formação deste cofator essencial. As sulfonamidas são, portanto, agentes bacteriostáticos que atuam como antimetabólitos do ácido paminobenzoico, substrato para a di-hidropteroato sintetase bacteriana, impedindo a formação do di-hidropteroato e, conseqüentemente, do N5 N10-metileno-tetra-hidrofolato. (GUIMARÃES; DA SILVA MOMESSO; PUPO, 2010).

2.5. Produção e Desenvolvimento de Fitoterápicos

Os laboratórios farmacêuticos de produtos fitoterápicos são um segmento do mercado que estão em desenvolvimento pelo mundo e pode se apresentar como uma grande oportunidade para o setor no Brasil trabalhando para fornecer à população medicamentos seguros, eficazes, com qualidade e preços acessíveis. Essas indústrias se empenham para inovar na área da fitoterapia, ampliando os espectros farmacológicos das drogas e modernizando a exploração da biodiversidade brasileira, com o intuito de melhorar a atenção à saúde e a inclusão social (HASENCLEVER et al., 2017).

A grande procura por medicamentos fitoterápicos na atualidade se justifica pelas inúmeras pesquisas que comprovam cientificamente a eficácia de determinados produtos e a escolha pela população para tratar de doenças com produtos considerados naturais (FRANÇA; VASCONCELLOS, 2019).

Com os avanços das pesquisas científicas, ocorre um aumento no número de patentes requeridas junto ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial (INPI) no que se refere aos fitoterápicos, fato este comprovado pelos estudos de França & Vasconcellos (2019) que realizaram um levantamento dos pedidos de patentes no INPI solicitadas entre os anos de 1995 e 2017. Até o ano de 2017 havia no Brasil 1.977 pedidos de patentes de medicamentos fitoterápicos sendo que destes, apenas 12 cartas patentes foram concedidas. Do número total de depósitos de patentes, apenas 16,5% (n=145) são de propriedades de pessoas jurídicas, que totalizam apenas 74 empresas, dentre

elas: Laboratório Aché, Chemyunion Química Ltda., Hebron Farmacêutica, Laboratório Catarinense, Boticário, Herbarium, Natura, Solabia.

No mercado de fitomedicamentos, os investimentos em P&D são ainda incipientes no Brasil, estando restritos a um reduzido número de empresas (KLEIN et al., 2009). Em um estudo comparado entre os anos 2009 e 2015, qual fora realizado por Hasenclever et al. (2017), foi observado um processo de reconfiguração na indústria farmacêutica de fitoterápicos, onde reduziu o número de empresas detentoras de registro e também o número de produtos registrados na Anvisa. No ano de 2009 existiam 166 empresas com registros de produtos fitoterápicos. Já no ano de 2015 esse número foi reduzido para 67, uma diminuição de 40,4% dessas pessoas jurídicas. Em 2009 existiam empresas possuidoras de registros na Amazônia, nos estados do Amazonas, Roraima e em estados do NE, Maranhão, Ceará e Paraíba, no entanto, ano de 2015 empresas destes estados perderam a autorização. Isto parece ser consequência da equiparação das exigências, as mesmas feitas aos alopáticos, pela RDC Nº 48/2010 aos medicamentos fitoterápicos, através da que passou a exigir testes clínicos aos produtos. Pelo lado positivo da situação, estes estudos servirão para complementar os dados de segurança e eficácia da droga.

As principais fontes de matérias-primas para o mercado global de fitoterápicos são as florestas tropicais, que estão localizadas em países em desenvolvimento, como por exemplo o Brasil, o qual é detentor de aproximadamente um terço da flora mundial. No entanto, os países desenvolvidos estão na cadeia de produção dos fitoterápicos como os maiores fabricantes do setor e os que mais investem na inovação farmacêutica tanto alopática quanto fitoterápica. Para o desenvolvimento de um produto fitoterápico, o altíssimo investimento chega a se equiparar com o dos medicamentos alopáticos (KLEIN et al., 2009).

Na primeira década do fluxo da pesquisa, as custas estão voltadas somente para pesquisa e desenvolvimento do produto. Já no décimo primeiro ano, as despesas começam a diminuir, pois começam os investimentos em produção, comercialização e divulgação do novo produto, e reduzindo cada vez mais com o passar dos anos (KLEIN et al., 2009). Todo o curso da produção de um fitomedicamento parte da premissa do conhecimento antropológico, o dito conhecimento tradicional do uso de plantas medicinais. As plantas medicinais e os produtos fitoterápicos podem possuir a mesma eficiência farmacológica do que os produtos sintéticos unimolecular de uso

nas terapias diversas. No entanto, para se chegar até um medicamento com base em produtos naturais, deve-se atentar a manutenção da molécula química presente no vegetal, assim confirmando a sua atividade farmacológica e a sua segurança na terapia (TOLEDO et al., 2003).

Ao produzir um fitoterápico, torna-se necessário a realização de parcerias entre universidades e empresas para a realização de estudos preliminares no que se refere às perspectivas antropológicas, etnofarmacologia, etnobotânicas, agrônomas, fioquímicas, farmacognosia, farmacológicas, toxicológicas, biotecnológicas, tecnologia farmacêutica, química orgânica e o desdobramento de métodos analíticos e tecnológicos (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; KLEIN et al., 2009).

Logo, o ponto de partida para o desenvolvimento de um medicamento fitoterápico é o levantamento etnofarmacológico, etnobotânico, pesquisas bibliográficas, observação do uso popular por comunitários e a pesquisa dos determinados grupamentos químicos presentes no material vegetal (TOLEDO et al., 2003). No levantamento bibliográfico, pode ocorrer a seleção do produto a ser produzido por intermédio de uma análise quimiotaxonômica pelo qual os aspectos morfológicos e a identificação de grupos botânicos podem sinalizar a existência de certos grupamentos químicos que possam vir apresentar atividade biológica (KLEIN et al., 2009).

Após esse levantamento são realizados os procedimentos de coleta do material botânico, preparação da exsicata e identificação correta das espécies em um herbário oficial com o propósito de certificar taxonomicamente o material botânico (TOLEDO et al., 2003). Como problemas encontrados nessa fase, têm-se o desconhecimento da origem da matéria-prima, a complexidade e a variabilidade da composição química das substâncias ali presentes. Esta última dificuldade apresentada remete às condições do plantio, coleta, manuseio e processamento do produto vegetal bruto (KLEIN et al., 2009).

Logo em seguida, dá-se encaminhamento aos estudos agronômicos para a obtenção de uma produção com matéria-prima homogênea, aumento da capacidade produtiva, melhoramento genético, e ainda realizando a preservação da espécie e a biodiversidade (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; TOLEDO et al., 2003). Quando o produto vegetal a ser utilizado na industrialização do medicamento tem o fornecimento terceirizado, seja por comunitários ou por grandes agricultores, a

qualidade da matéria prima adquirida deve ser atestada, o local do plantio e colheita do material deve ser inspecionado e amostras do lote deve ser analisada minuciosamente. Nesta etapa é imprescindível adotar características rígidas na avaliação. Em casos de material vegetal em descordo, deve-se informar aos fornecedores sobre a situação do material atestado e a não conformidade do produto a fim de manter um padrão homogêneo de qualidade (KLEIN et al., 2009).

O próximo passo a ser dado compreende a realização das pesquisas fitoquímicas para esclarecer mais sobre as estruturas químicas dos produtos, identificação dos compostos majoritários da matéria-prima ou intermediários do produto final que são ou não responsáveis pelo efeito farmacológico e estabelecimento dos marcadores químicos imprescindíveis para o monitoramento e planejamento de ações tecnológicas juntamente com os estudos de estabilidade dos produtos. Boa parte dessa caracterização se dá por métodos cromatográficos modernos, como a cromatografia gasosa (GC), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), ambos sistemas acoplados a um espectrômetro de massas (MS), entre outros detectores (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005; TOLEDO et al., 2003).

O estudo da atividade biológica engloba toda segurança e eficácia envolvida no produto sugerido. Levando em consideração a planta medicinal que se propõe estudar, realiza-se então a escolha da atividade farmacológica, o farmacógeno, quais substâncias presente na constituição química que podem realizar a ação biológica proposta, descoberta da concentração e potência de efeito e ainda a investigação da presença de substâncias tóxicas (TOLEDO et al., 2003). Todas essas investigações validam o processo tecnológico, reafirmam a atividade biológica e colabora para a conservação da composição química do produto. A ausência dos efeitos tóxicos no produto é o que determina a segurança, bem como a ausência de contaminantes que são prejudiciais a saúde, como agrotóxicos, metais pesados e microorganismos. Já a eficácia se dá via estudos farmacológicos pré-clínicos e clínicos da droga estudada para os efeitos biológicos propostos (KLEIN et al., 2009).

Para Lopes et al., (2017), os dados toxicológicos baseados em pesquisas das plantas medicinais em geral são limitados. O uso desses vegetais de forma tradicional, ou seja, *in natura*, pode não ser uma terapia completamente segura. Mesmo o uso por centenas de anos pode manter reações indesejáveis passadas despercebidas

(LOPES; NASCIMENTO; 2017, 2017). Em muitos casos, pode-se afirmar a frase eternizada de Paracelso, médico suíço que viveu no século XV, “*dosis sola facit venenum*”, que o traduzindo quer dizer que a diferença entre o remédio e o veneno está na dose. Assim, o também alquimista formado na Universidade de Viena, antecipou a possibilidade certos venenos atuarem como medicamentos se administrados em doses adequadas (GONZÁLEZ MARTÍN, 2017). Após todo esclarecimento acerca da composição química, identificação dos compostos, efeitos biológicos no indivíduo, são realizados estudos que avaliem a qualidade do produto para garantir a segurança e eficácia da droga (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005).

Entre os testes desenvolvidos, têm-se o de teor de substâncias, estudos de estabilidade da formulação, estudos farmacocinéticos e farmacodinâmicos, mensuração das características físicas e físico-químicas, quantificação das substâncias ativas, estudos microbiológicos, entre outras, a fim de assegurar a qualidade do produto (BASSANI; GONZÁLES; PETROVICK, 2005). O teste microbiano se torna necessário pelo fato de que os produtos vegetais geralmente contêm em sua superfície fungos e bactérias que compõem a microbiota normal ou que são introduzidos no decorrer do manuseio. Para este teste, há um requisito mínimo preconizado pelos órgãos reguladores e OMS para cada forma farmacêutica. Sem a padronização, os medicamentos fitoterápicos não atingirão a qualidade requerida e nenhuma indústria poderá garantir a eficácia do produto visto que ela desconhece a concentração dos constituintes da formulação (KLEIN et al., 2009).

2.5.1. Regulação: Aspectos legais na regulação de medicamentos fitoterápicos no Brasil na etapa pré-clínica

O setor farmacêutico passou a ser regulado em meados da década de 70. A primeira normatização veio ser homologada em 1973 mediante a publicação da Lei Nº 5.991, que controla sanitariamente o comércio de drogas, medicamentos, insumos farmacêuticos e correlatos. Entretanto, ainda não era legitimado a fitoterapia nesta norma. Somente no ano de 2006 a fitoterapia foi introduzida no Sistema Único de Saúde, por meio da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares e Política Nacional de Plantas Medicinais. Com o passar dos anos, a ANVISA foi

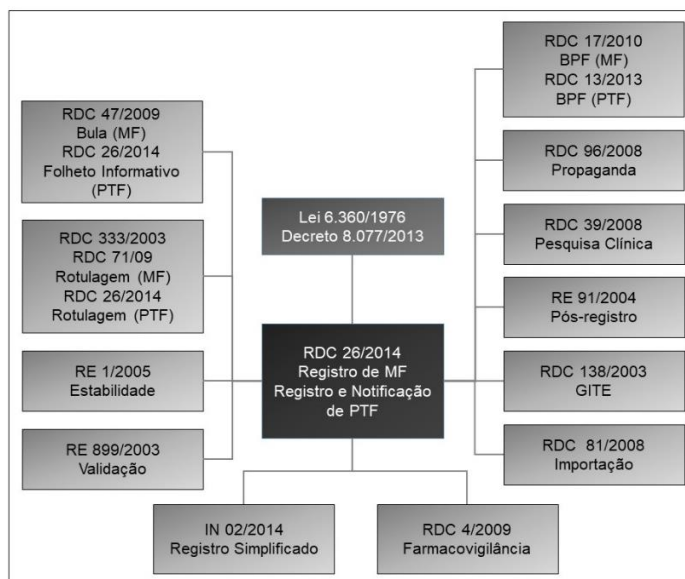
adequando suas normas até chegar na mais nova resolução que rege os fitoterápicos, a RDC 26 de 2014 (SÁ et al., 2018).

O aumento no interesse nas terapias com produtos naturais pela população juntamente com a maior biodiversidade do planeta, fizeram com que o Brasil despertasse o desejo pelo desenvolvimento de novos fitoterápicos. Em terras brasileiras há um parque industrial farmacêutico muito desenvolvido. No entanto, o desenvolvimento de novos produtos não se encontra tão avançada, mas surge a necessidade de atualizar as normas vigentes para garantir a qualidade, segurança e eficácia dos atuais e novos fitoterápicos no intuito de propor um adequado tratamento das doenças (LOPES; NASCIMENTO; 2017, 2017).

Com toda essa ascensão voltada aos produtos de origem vegetal para fins terapêuticos, a Anvisa resolveu flexibilizar o registro desses remédios de uso tradicional mediante a publicação da Resolução de N° 26, de 13 de maio de 2014, que dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e notificação de produtos tradicionais fitoterápicos, ambos industrializados, apresentando parâmetros inovadores para a comprovação da segurança e efetividade como o reconhecimento dos efeitos no decorrer do longo tempo de uso, por no mínimo 30 anos, proporcionando uma maior agilidade na regulação destes produtos (LOPES; NASCIMENTO; 2017, 2017).

Com esta publicação, a instituição regulamentadora revogou as normas anteriores que ordenava todo o registro de fitoterápicos no Brasil, como RDC nº 14, de 31 de março de 2010, e RDC nº 10, de 9 de março de 2010, a Resolução - RE nº 90, de 16 de março de 2004, e a Instrução Normativa - IN nº 5, de 31 de março de 2010 (ANVISA, 2014a; ANVISA, 2014c). Para auxiliar as empresas, a ANVISA publicou a Instrução Normativa IN Nº 04, de 18 de junho de 2014, pelo qual aprova o Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Para produção do documento, a ANVISA detalhou todas as normas que se refere ao registro e notificação de fitoterápicos, conforme Figura 11.

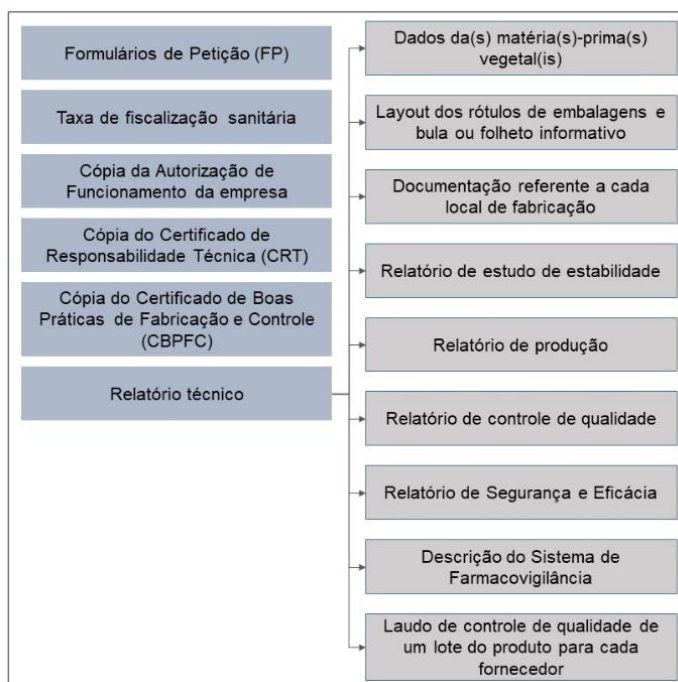
Figura 11 - Normas aplicáveis ao registro e notificação de fitoterápicos.



Fonte: Modificado de Adaptado de ANVISA (2014a).

O órgão sanitário regulador brasileiro, atendendo a Instrução Normativa Nº 04/2014, preparou um fluxograma a ser adotado pelas empresas solicitantes do registro de medicamentos fitoterápicos e dos produtos tradicionais fitoterápicos, para seguir uma sequência de procedimentos até a liberação do produto para comercialização (Figura 12) (ANVISA, 2014a).

Figura 12 - Documentação necessária para solicitar registro de MF e PTF na Anvisa.



Fonte: Adaptado de ANVISA (2014a).

De acordo com a IN Nº 04, de 18 de junho de 2014, ficou definido que os medicamentos fitoterápicos são aqueles produtos fabricados com emprego exclusivo de matéria-prima vegetal ativa e que tenha a segurança e eficácia baseadas em estudos clínicos, caracterizados pela constância de sua qualidade e é passível de registro ou registro simplificado. Já os produtos tradicionais fitoterápicos também são produzidos com emprego de matérias-primas vegetal ativa, entretanto, sua segurança e eficácia são baseadas em tempo de uso por meio de resultados em literaturas técnico-científica publicados, e que sejam contemplados para utilização sem a vigilância médica para fins de diagnóstico, prescrição ou de monitorização. Este tipo de produto não pode conter excipientes ou substâncias que sejam consideradas tóxicas, não pode ser administrado por via oftálmica ou intravenosa, não pode se referir a algum desequilíbrio homeostático considerada grave e é passível de registro, registro simplificado ou sistema de notificação pela ANVISA (ANVISA, 2014a).

Ainda segundo esta instrução normativa, a comprovação da segurança e eficácia por tradicionalidade de uso é orientado pela OMS e está disposto nas principais legislações internacionais como Comunidade Européia (European Medicines Agency – EMA), Canadá (Health Canada – HC), Austrália (Therapeutic Goods Administration – TGA), México e, agora com o Brasil. Outro tópico importante abordado nesta norma tange ao registro de produtos simplificado visto que o fabricante não necessita comprovar a SE, pois o agente regulador já realizou anteriormente e publicou a lista de fitoterápicos de registro simplificado (ANVISA, 2014a).

Esta resolução traz a regulação do registro simplificado de produtos fitoterápicos, pelos quais prevê uma facilidade por intermédio da presença do produto na Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, conforme IN nº 2, de 13 de maio de 2014, que lista os medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais que poderão ter registro simplificado na ANVISA, ou suas atualizações ou a presença nas monografias de fitoterápicos de uso tradicional da Comunidade Europeia (Community herbal monographs with traditional use) elaboradas pelo Comitê de Fitoterápicos da Comunidade Europeia (HMPC – EMA) (ANVISA, 2014b; Lopes et al., 2017).

Ainda de acordo com a normativa vigente, RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014, antes de registrar um produto, o solicitante deve primeiramente solicitar à

Farmacopeia Brasileira a inclusão do novo constituinte do fitoterápico na lista da Denominação Comum Brasileira (DCB), caso este material ainda não esteja contido na lista. Após esta etapa, procede-se à comprovação das documentações, que vão desde a empresa solicitante do registro, o responsável técnico, certidões da ANVISA, pagamentos de taxas, apresentação de cópias do Certificado de Boas Práticas de Fabricação e Controle (CBPFC) válido (ANVISA, 2014c).

Juntamente com os arquivos acima, o Relatório Técnico deve ser protocolado com as seguintes informações, com:

Art. 8º O relatório técnico deve conter as seguintes informações:

- I - dados das matérias-primas vegetais, incluindo:
 - a) nomenclatura botânica completa; e
 - b) parte da planta utilizada;
- II - layout dos rótulos das embalagens primária e secundária;
- III - layout de bula para medicamento fitoterápico ou folheto informativo para produto tradicional fitoterápico;
- IV - documentação referente a cada local de fabricação, caso a empresa solicite o registro em mais de um local de fabricação;
- V - relatório do estudo de estabilidade;
- VI - relatório de produção;
- VII - relatório de controle da qualidade;
- VIII - relatório de segurança e eficácia/efetividade, quando aplicável;
- IX - descrição de sistema de farmacovigilância, conforme RDC nº 4, de 10 de fevereiro de 2009, que dispõe sobre as normas de farmacovigilância para os detentores de registro de medicamentos de uso humano, ou suas atualizações; e
- X - laudo de controle da qualidade de um lote do fitoterápico para cada um dos fornecedores qualificados, sendo aceitos, no máximo, três fornecedores de IFAV por forma farmacêutica a ser registrada.

§ 1º No caso de existência de mais de um fornecedor, deverá ser apresentado laudo de controle da qualidade de três lotes para o primeiro fornecedor e de um lote para cada um dos fornecedores adicionais.

§ 2º Para cada forma farmacêutica, os fornecedores devem apresentar especificações semelhantes quanto ao marcador, teor, tipo de solvente, extrato utilizado e relação droga: derivado vegetal a fim de garantir a manutenção das especificações do produto acabado.

O Relatório do estudo de estabilidade do produto proposto é um documento que demonstra os resultados dos estudos da conservação, provas e critérios de aceitabilidade, características dos lotes estudados, quantidade das amostras, condições submetidas ao estudo, métodos analíticos adotados e material de armazenamento. Este documento será apresentado pela requerente acompanhado dos estudos de estabilidade de longa duração já concluídos ou do estudo de 3 lotes pilotos em andamento, ambos de acordo com a Resolução RE nº 1, de 29 de julho de 2005, que publicou o Guia para a realização de estudos de estabilidade (ANVISA, 2014c; ANVISA, 2005; ANVISA, 2014a).

O Relatório de produção e controle da qualidade deverá dispor das seguintes informações: sobre a forma farmacêutica do produto proposto; descrição da fórmula com nomes químicos; informação da quantidade de cada constituinte expressa no Sistema Internacional de unidades (SI) por unidade farmacotécnica, juntamente com suas respectivas funções na formulação; mensuração do tamanho dos lotes industriais, sendo apresentado o valor mínimo e o máximo; demonstração por fluxograma de todas os processos envolvidos na produção e controle dos mesmos; e descrição dos lotes (ANVISA, 2014c; ANVISA, 2005; ANVISA, 2014a).

No relatório de controle da qualidade, deve vir constituído dos dados: sobre o controle da Encefalopatia Espongiforme Transmissível (EET), conforme RDC nº 305, de 14 de novembro de 2002; dossiê e controle das análises de todo os excipientes aplicado para produzir o medicamento; referências farmacopeicas consultadas e reconhecidas pela Anvisa para o controle do Insumo farmacêutico ativo vegetal (IFAV) e produto acabado, conforme RDC nº 37, de 6 de julho de 2009; identificação do material da embalagem (ANVISA, 2002; RESOLUÇÃO Nº 37, DE 6 DE JULHO DE 2009).

Para o relatório de segurança e eficácia (SE) dos medicamentos fitoterápicos, as ações biológicas devem ser justificadas pela realização de ensaios não clínicos e clínicos de segurança e eficácia. Os ensaios não clínicos deverão ser produzidos com base na última versão do “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, no que for inerente aos fitoterápicos. A agência reguladora brasileira ainda facilita às empresas da indústria farmacêutica a comprovação dos ensaios não-clínicos e clínicos por meio de documentação técnico-científica para respaldar a qualidade e representatividade do estudo no que se refere a tradicionalidade de uso. Nesse caso, as pesquisas devem ter sido realizadas com o mesmo produto vegetal e posologia descrita (ANVISA, 2014c; ANVISA, 2013).

Para a realização dos estudos não-clínicos que corresponde aos estudos biomédicos em indivíduos não-humanos, deve-se tomar como base o “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”. Entretanto, fica dispensado a realização dos testes prescritos pelo Guia acima caso a solicitante consiga comprovar

a segurança do fitoterápico por outras referências bibliográficas que os tornam mais viáveis e que serão apreciados pela ANVISA (ANVISA, 2014b; ANVISA, 2013).

Antes de dar início a etapa dos ensaios clínicos, deve ser submetido os estudos à anuência da Anvisa para emissão do Comunicado Especial (CE). Em casos de produtos associados, todos os dados de segurança e eficácia deverão ser apresentados para a associação que se pretende registrar (ANVISA, 2014a; ANVISA, 2014c).

Em substituição aos testes prescritos pelo “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos”, a Resolução Normativa 04 de 24 de setembro 2014 flexibiliza a utilização de métodos alternativos *in vitro* em substituição os *in vivo*, desde que validados e aceitos internacionalmente (BRASIL, 2014).

2.5.2. Aspectos éticos envolvidos na experimentação animal para desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e as alternativas experimentais

Segundo Dalben & Emmel (2013), cerca de 150 milhões de animais são utilizados experimentalmente na pesquisa científica e nas indústrias. Desse quantitativo, apenas 37,5 milhões de indivíduos (25%) chegam a contemplar os artigos científicos. De todo esse montante, a maioria passa por maus-tratos e sofrimentos e que não levará a nenhuma promoção de benefício à humanidade.

Nos estudos experimentais e em aulas práticas ainda se têm muito o costume do uso de animais. No entanto, várias são as discussões voltadas ao uso destes seres. As normativas que tratam desse tema passam por constantes mudanças com o decorrer dos avanços científicos e tecnológicos (GARCIA; LIMA, 2018).

Uma normativa que veio a assegurar o uso dos animais em experimento no Brasil foi a Lei Nº 9.605, que aborda os maus-tratos em animais como crimes ambientais juntamente com o uso deles em experimentos quando se tem métodos alternativos. Como alternativa a essas más condutas, a lei regulamenta que os pesquisadores adequem seus métodos utilizados, com a possibilidade de opção à experimentos alternativos. Com o entendimento da lei, os pesquisadores Garcia & Lima (2018) entendem que com a submissão de estímulos cruéis e dolorosos aos animais, sempre será um ato criminoso quando existem possibilidades de escolha de outros

métodos que substituam o escolhido, reduza o número de animais e refine o estímulo doloroso (DALBEN; EMMEL, 2013; GARCIA; LIMA, 2018; SOBRINHO et al., 2017).

Um marco histórico no Brasil aconteceu no dia 08 de outubro de 2008, onde o Presidente do país, Luiz Inácio Lula da Silva, assinou a Lei nº 11.794 que estabelece os procedimentos necessários a serem adotados para o uso de animais em experimentação no ensino superior e pesquisa científica. O objetivo dessa nova lei não foi a discussão do uso ou não uso de animais, mas a manutenção do controle da situação. Nessa norma, que também ficou conhecida como Lei Arouca, ficou determinado as condições que esses seres vivos devem ser criados, evitando maus-tratos e foi criado o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) que está ligado ao Ministério de Ciência Tecnologia e Inovação. Esta lei recebeu este nome por causa do autor de seu esboço, Sérgio Arouca, que foi um pesquisador da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), deputado federal e um adepto da teoria dos 3R's (replacement, reduction e refinement) (Brasil, 2008; D. Garcia & Lima, 2018; Sobrinho et al., 2017).

Os princípios éticos da teoria dos 3R's remete à comunidade científica uma lembrança de alternativas. O primeiro "R" quer dizer que na nova concepção dos usos de animais experimentais, deve-se substituir (*replacement*) a técnica adotada por outra mais viável e aceita, como por exemplo métodos in vitro, plantas, microrganismos etc. O segundo "R" se refere à redução (*reduction*) o número de indivíduos quando não se consegue mudar para outros métodos. O terceiro e último "R" remete ao refinamento (*refinement*) ou minimização dos desconfortos ou estímulos dolorosos aos animais, como por exemplo a aplicação de anestésicos com o intuito de minimizar o sofrimento (SOBRINHO et al., 2017). Essas diretrizes, que foram propostas pela primeira vez por Russel e Burch em 1959, fazem parte dos princípios do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (DALBEN; EMMEL, 2013).

De acordo com a Lei nº 11.794/2008, o CONCEA ficou responsável por acompanhar e fiscalizar os institutos de pesquisa que são cadastrados no seu sistema e que realizem a utilização de animais com apoio dos Comitês de ética de uso animal (CEUA). Esse processo de fiscalização torna-se um pouco dificultosa e para que se torne eficiente, exige a existência de um Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) em cada instituição que realiza experimentação com animais. Ainda de acordo com a lei relatada acima, ela não cita ou referência os princípios do 3R's, não relata a

expressão “respeito aos animais”, embora que no § 4º do artigo 14 há orientação para que o número de animais utilizados seja solicitado o mínimo (DALBEN; EMMEL, 2013).

No Brasil, não há lei federal que proíba o uso de animais em estudos de cosméticos e medicamentos. No entanto, alguns estados brasileiros tomaram a frente e criaram suas próprias leis que proíbem o uso de animais em experimentos de cosméticos e seus ingredientes, como os estados de São Paulo (2014), Mato Grosso do Sul (2014), Amazonas (2015), Paraná (2015), Pará (2016), Rio de Janeiro (2017), Minas Gerais (2018), Santa Catarina (2020) e Espírito Santo (2021) (PEDRO, 2021).

2.5.3. Uso de métodos experimentais alternativos ao uso de animais

Com a criação do Concea pela Lei nº 11.794/2008, algumas normas foram assinadas para incentivar o desuso de animais em experimentos e aumentar a prática de estudos em métodos alternativos como as pesquisas in vitro (BRASIL, 2008).

Em busca do cumprimento e adesão aos princípios dos 3R's, o Brasil está evoluindo com a validação de métodos alternativos e internacionalmente válidos. Esse desenvolvimento resultou na criação da Rede Nacional de Métodos Alternativos (RENAMA) em 03 de julho de 2012, através da Portaria Nº 491 do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI) (Brasil, 2012a). Essa rede foi instituída com o objetivo de incentivar a inserção dos ensaios alternativos ao uso de animais mediante treinamentos e oficinas, controlar periodicamente a desenvoltura dos laboratórios credenciados por meio de comparações inter-laboratoriais, promover a qualidade dos ensaios pelo desenvolvimento de materiais de referência químicos e biológicos certificados, quando aplicável; incentivar a implementação do sistema de qualidade laboratorial e dos princípios das boas práticas de laboratório (BPL); e promover o desenvolvimento, a validação e a certificação de novos métodos alternativos ao uso de animais. Todo esse projeto será desenvolvido em Laboratórios do Instituto Nacional de Metrologia Qualidade e Tecnologia (INMETRO), Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), Laboratório Nacional de Biociências (LNBio) e espaços de Universidades e Institutos de Pesquisa e/ou Desenvolvimento que possuam metodologias e equipamentos para atuação na área de métodos alternativos ou laboratórios altamente especializados (BRASIL, 2012a).

Em setembro de 2012 foi criado o Centro Brasileiro de Validação de Métodos Alternativos (BraCVAM), que é fruto de uma Acordo de Cooperação entre o Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde (INCQS), da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Esta instituição ficou encarregada de validar e coordenar os estudos da redução, refinamento e/ou substituição dos animais em experimentação para investigação da segurança e eficácia de cosméticos, medicamentos e outras categorias de produtos às quais esses ensaios se aplicam (EBERLIN et al., 2019).

A ANVISA, mediante a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 35 de 07 de agosto de 2015, homologou a aceitação de métodos alternativos de experimentação animal, desde que sejam reconhecidos no Brasil pelo CONCEA e que objetive a execução de um dos princípios dos 3R's nas atividades de pesquisas. Ainda nesta mesma RDC, o órgão regulador brasileiro expõe que os métodos aceitos devem ser baseados nos termos da Resolução Normativa Nº 17, de 03 de julho de 2014, qual foi emitida pelo CONCEA (2014) e “dispõe sobre o reconhecimento de métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil e dá outras providências” (BRASIL, 2015).

Sendo assim, o CONCEA, que é um órgão com caráter normativo, deliberativo, consultivo e recursal, ficou incumbido de reconhecer, validar e manter em seu sítio eletrônico a lista de métodos alternativos reconhecidos. Atualmente, existem 41 métodos reconhecidos por este conselho nacional. A primeira Resolução Normativa homologada foi a de Nº 18, assinada em 24 de setembro de 2014, pela qual a instituição reconhece 17 métodos alternativos agrupados em 7 categorias e estão descritas à seguir (OECD, 2005; CONCEA, 2014).

- I - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão da pele:
 - a) Método OECD TG 430 - Corrosão dérmica in vitro: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea;
 - b) Método OECD TG 431 - Corrosão dérmica in vitro: Teste da Epiderme Humana Reconstituída;
 - c) Método OECD TG 435 - Teste de Barreira de Membrana in vitro; e
 - d) Método OECD TG 439 - Teste de irritação Cutânea in vitro.
- II - Para avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:
 - a) Método OECD TG 437 - Teste de Permeabilidade e Opacidade de Córnea Bovina;
 - b) Método OECD TG 438 - Teste de Olho Isolado de Galinha; e
 - c) Método OECD TG 460 - Teste de Permeação de Fluoresceína.
- III - Para avaliação do potencial de Fototoxicidade:
 - a) Método OECD TG 432 - Teste de Fototoxicidade in vitro 3T3 NRU.
- IV - Para avaliação da absorção cutânea:

- a) Método OECD TG 428 - Absorção Cutânea método in vitro.
- V - Para avaliação do potencial de sensibilização cutânea:
 - a) Método OECD TG 429 - Sensibilização Cutânea: Ensaio do Linfonodo Local; e
 - b) Método OECD TG 442A e 442B - Versões não radioativas do Ensaio do Linfonodo Local.
- VI - Para avaliação de toxicidade aguda:
 - a) Método OECD TG 420 - Toxicidade Aguda Oral - Procedimento de Doses Fixas;
 - b) Método OECD TG 423 - Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda;
 - c) Método OECD TG 425 - Toxicidade Aguda Oral - procedimento "Up and Down"; e
 - d) Método OECD TG 129 - estimativa da dose inicial para teste de toxicidade aguda oral sistêmica.
- VII - Para avaliação de genotoxicidade:
 - a) Método OECD TG 487 - Teste do Micronúcleo em Célula de Mamífero in vitro.

A outra Resolução Normativa que reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, é a de Nº 31 de 18 de agosto de 2016 (CONCEA, 2016), que reconhece mais 7 métodos alternativos e que estão agrupados em 4 categorias, sendo elas:

- I - Avaliação do potencial de irritação e corrosão ocular:
 - a) Método OECD TG 491 - Teste in vitro de curta duração para danos oculares;
 - b) Método OECD TG 492 - Epitélio corneal humano reconstruído;
- II - Avaliação do potencial de sensibilização cutânea:
 - a) Método OECD TG 442C - Sensibilização cutânea in chemico;
 - b) Método OECD TG 442D - Sensibilização cutânea in vitro;
- III - avaliação de toxicidade reprodutiva:
 - a) Método OECD TG 421 - Teste de triagem para toxicidade reprodutiva e do desenvolvimento;
 - b) Método OECD TG 422 - Estudo de toxicidade repetida combinado com teste de toxicidade reprodutiva; e
- IV - Avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis:
 - a) Teste de Endotoxina Bacteriana (Farmacopeia Brasileira)

Para complementar as normas anteriores, o CONCEA publicou a Resolução de Nº 45 de 22 de outubro de 2019. Esta normativa reconhece mais um método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, que é o Teste de Ativação de Monócitos qual possui capacidade de avaliar a contaminação pirogênica em produtos injetáveis (CONCEA, 2019).

Em 05 de Outubro de 2022, graças a Resolução Nº 56, o CONCEA reconheceu 16 novos métodos alternativos ao uso de animais em experimentação, dispostos em 7 categorias e estão descritos a seguir (BRASIL, 2022):

I - SAÚDE HUMANA

1 - Sensibilização dérmica

- a) Método OECD TG 442E - Sensibilização cutânea in vitro: ensaios de sensibilização cutânea in vitro abordando o evento chave na ativação de células dendríticas no Caminho da Resposta Adversa (AOP) para sensibilização cutânea.

2 - Avaliação de efeitos estrogênicos

- a) Método OECD TG 455 - Teste baseado na performance para ensaios in vitro de transativação transfectada estável para detectar agonistas e antagonistas de receptor estrogênico.
- b) Método OECD TG 493 - Teste baseado na performance para ensaios in vitro de receptor estrogênico humano recombinante (hrER) para detectar substâncias químicas com afinidade de ligação ER.

3 - Efeitos endócrinos

- a) Método OECD TG 456 - Ensaio de Esteroidogênese H295R.

4 - Efeitos androgênicos

- a) Método OECD TG 458 - Ensaio de ativação transcripcional de receptores androgênicos humanos transfectados para detecção de atividade agonista e antagonista de substâncias químicas.

5 - Mutagenicidade

- a) Método OECD TG 471 - Teste de mutação bacteriana reversa.
- b) Método OECD TG 473 - Teste in vitro de aberração cromossômica de mamíferos.
- c) Método OECD TG 476 - Testes in vitro de mutação gênica de células de mamífero usando os gens Hprt and xprt.
- d) Método OECD TG 490 - Testes in vitro de mutação gênica em células de mamífero usando gen Timidinaquinase.

6 - Irritação/corrosão ocular

- a) Método OECD TG 494 - Vitrigel - Teste de irritação ocular para identificação de substâncias químicas que não requerem classificação e rotulagem para irritação ocular ou sério dano ocular.
- b) Método OECD TG 496 - Teste macromolecular in vitro para identificação de substâncias químicas que induzem dano ocular severo e substâncias químicas que não requerem classificação para irritação ocular ou dano ocular severo.

7 - Fotorreatividade

- a) OECD TG 495 - Ensaio de fotorreatividade por Ros (Espécies oxigênio reativas).

II - EFEITOS EM SISTEMAS BIÓTICOS

- a) Método OECD TG 212 - Peixe, teste de toxicidade a curto prazo em estágios embrionários e recém-nascidos.
- b) Método OECD TG 236 - Toxicidade aguda em embrião de peixe (FET).
- c) Método OECD TG 319-A - Determinação do "clearance" intrínseco "in vitro" usando hepatócitos criopreservados de Truta Arco-Íris (RT-HEP).
- d) Método OECD TG 319-B - Determinação do "clearance" intrínseco "in vitro" usando fração sub-celular S-9 de Truta Arco-Íris (RT-S9).

As quatro resoluções com seus 41 métodos, as quais foram todas validadas pelo BraCVAM, prezam a substituição total, substituição parcial ou redução do número de animais em experimentos e foram selecionados com base no Guia 34 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD, 2005). A OECD é uma organização intergovernamental que representa mais de 30 países, e

tem a honraria de coordenar e harmonizar, discutir questões de preocupação mútua e trabalhar juntos para atender e responder problemas internacionais. Com as várias publicações realizadas pela OECD, tornou-se possível a substituição do uso de animais em pesquisas de produtos cosméticos e medicamentos em muitos países. Na sua Divisão de Meio Ambiente, Saúde e Segurança (EHS, sigla em inglês para Environment, Health and Safety), a instituição é responsável pela publicação de diretrizes que norteiam os estudos de segurança dos produtos, como medicamentos, saneantes, cosméticos, entre outros (EBERLIN et al., 2019).

O “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” foi desenvolvido com o intuito de racionalizar os estudos não clínicos, evitar a duplicidade de estudos, racionalizar o uso de animais em experimentação. Neste manual, são desenvolvidos alguns testes in vivo, os quais têm como base algumas instituições como OECD (The Organisation for Economic Co-operation and Development), FDA (Food and Drug Administration), EMA (European Medicines Agency), ICH (The International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use) e OMS (Organização Mundial de Saúde), que visam a maior harmonização com a regulamentação internacional (BRASIL, 2013).

Como vantagens da utilização de testes alternativos têm-se: o não uso de animais nos experimentos; redução dos custos por não ser necessário a construção e manutenção da infraestrutura de um biotério juntamente com os cuidados aos roedores; baixa possibilidade de interferentes externos, sendo que os animais são muito sensíveis a algumas variações como temperatura, luminosidade, ruídos, alimentação etc.; e a redução dos espaços necessários aos estudos in vitro (COSTA J. et al., 2014).

Para estudos da capacidade de irritação e corrosão dérmica, conforme as resoluções do CONCEA, são utilizados métodos in vitro em amostras de pele de animal, pele humana reconstituída ou epitélio artificial semelhante à epiderme e derme, o que irá reduzir a dor e os sofrimentos nos animais. No entanto, estes testes são considerados qualitativos por conseguir somente diferenciá-las entre corrosivas e não corrosivas, sem mensurar a capacidade de causar a irritação dérmica como nos métodos in vivo (COSTA J. et al., 2014; PEDDRO, 2021).

Um dos métodos validados pelo BraCVAM e autorizados pelo CONCEA é o da OECD 430, Corrosão dérmica *in vitro*: Teste de Resistência Elétrica Transcutânea (In vitro skin corrosion – Transcutaneous Electrical Resistance Test - TER), que avalia se produtos em estudo promovem a perda da integridade do extrato córneo normal e da função de barreira, quantificado pela redução da resistência elétrica transcutânea. As substâncias classificadas como corrosivas causam uma redução nesse limiar (COSTA J. et al., 2014).

Outro método também aceito no Brasil é o da OECD TG 431, Corrosão dérmica *in vitro*: Teste da Epiderme Humana Reconstituída, que identifica produtos corrosivos por intermédio da penetração destes no extrato córneo por difusão ou erosão das camadas celulares, produzindo citotoxicidade nas camadas mais profundas. O teste da OECD 435, que corresponde ao Teste de Barreira de Membrana *in vitro*, trabalha no princípio da identificação de substâncias corrosivas através do tempo de penetração na membrana e as classifica de acordo com os critérios do GHS. Uma outra alternativa para avaliar a irritação/corrosão dérmica é o de teste de fototoxicidade, realizado *in vitro* em células 3T3 NRU (OECD 432), que mensura a redução da viabilidade das células quando expostas a um produto teste na presença e ausência de luz (COSTA J. et al., 2014).

Segundo o Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (BRASIL, 2012), como existem várias formas de irritação ocular, torna-se necessário a realização dos estudos alinhando a vascularização, opacidade/permeabilidade e citotoxicidade. Nessa temática de estudo, são aplicadas técnicas que usam a córnea bovina, de galinha, ou de coelho, rins de caninos ou modelos tridimensionais que são comercialmente disponibilizados e preparados a partir de queratinócitos humanos (PEDRO, 2021).

O Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos recomenda a realização de outros métodos. Um deles é o HET-CAM (Hen's Egg Test-Chorioallantoic Membrane/membrana corioalantóide) que avalia semi-quantitativamente a capacidade de promover a irritação de uma determinada substância em estudo, sobre a membrana corioalantóide de ovo embrionado de galinha, no décimo dia de incubação. Outro teste é o da Permeabilidade e opacidade de córnea bovina e o Olho Isolado de Galinha, os quais avaliam quantitativamente o potencial irritante de um ingrediente após aplicação sobre a córnea isolada de bovino

ou olho isolado de galinha, pela medida da opacidade e da permeabilidade após o contato com o produto teste. Já os testes de citotoxicidade estão representados pelo RBC – Red blood cell, que quantifica os efeitos adversos dos produtos em estudo sobre a membrana das hemácias que se rompem desnaturando a hemoglobina, e pelo tradicional ensaio de MTT (MTT ou brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), que correlaciona a percentagem da morte celular em função da concentração do produto que inibe 50% do crescimento celular (IC50). A capacidade fototóxica é mensurada pelo método de vermelho neutro NRU (Neutral Red Uptake) que avalia o potencial de captação do corante pelas células viáveis da espectrofotometria. Para (COSTA et al., 2014), o ensaio de RBC que foi citado acima, pode ainda servir como um teste para avaliação da sensibilização da pele (BRASIL, 2012; PEDRO, 2021).

A absorção Cutânea é avaliada com amostras de pele excisada. A avaliação do potencial de sensibilização cutânea pode ser estudada com camundongos (*in vivo*) em quantidades reduzidas quando comparado aos outros métodos não reconhecidos pelo CONCEA, também através da cultura de queratinócitos humanos em ensaios *in vitro* e, por método abiótico, em testes *in chemico* (PEDRO, 2021).

Para a determinação da toxicidade aguda, não se usa mais a morte como marcas de efeitos nocivos, e sim os sinais comportamentais, como os testes de toxicidade oral aguda, onde animais recebem uma dose pré-fixada e são observados no decorrer de 14 dias após a administração do tratamento (BRASIL, 2013; Pedro, 2021). A genotoxicidade é realizada com linfócitos de sangue periférico, seja de humanos ou outros mamíferos. A toxicidade reprodutiva é realizada pelo teste que avalia os parâmetros reprodutivos e, também, a análise de doses repetidas por tempo limitado. Já na avaliação da contaminação pirogênica em produtos injetáveis, é usada endotoxina bacteriana e técnica utilizando linhagem celular monocitária (PEDRO, 2021).

Com esses métodos classificados como alternativos ao uso de animais, a ciência está prezando mais pelos estudos *in vitro*, o que otimiza tempo e infraestrutura no desenvolvimento de estudos. Futuramente, mais métodos alternativos reconhecidos pelo CONCEA estarão autorizados para a realização dos estudos de segurança de cosméticos, medicamentos, cosmeceuticos, entre outros (COSTA J. et al., 2014; EBERLIN et al., 2019; PEDRO, 2021).

3. JUSTIFICATIVA

A Amazônia apresenta a maior biodiversidade do planeta, e com isso pode contribuir para o desenvolvimento da bioeconomia regional, assim como, para a descoberta de novos fármacos a partir das plantas medicinais usadas pelos povos tradicionais de diferentes etnias. Novas biomoléculas são importantíssimas para a expansão do arsenal terapêutico, para o tratamento de diversas doenças, redução dos efeitos adversos causados por fármacos sintéticos, aumento do espectro de ação farmacológica e maior segurança para o paciente, visto que, as biomoléculas têm demonstrado promover menores efeitos adversos. Grande parte dos medicamentos existentes na atualidade são derivados de biomoléculas que foram desenvolvidas a partir de estudos etnofarmacológico com levantamento de informações sobre o uso terapêutico de plantas medicinais. Nesse contexto, diversos vegetais são descritos como produtos tradicionais terapêuticos pelos povos tradicionais para algumas atividades farmacológicas. A copaíba, andiroba e o jucá são exemplos de plantas utilizadas desde os primórdios pelas populações das florestas e dos rios amazônicos para tratar suas enfermidades como infecções, febre, dor, inflamação e cicatrização. A grande quantidade de estudos etnofarmacológicos que descrevem as propriedades terapêuticas de centenas de plantas medicinais e os diversos trabalhos que também descrevem suas atividades farmacológicas, foram determinantes para que o Ministério da Saúde do Brasil incorporasse em sua Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Renisus) 71 plantas reconhecidas como medicinais com a intenção de promover o desenvolvimento de PD&I sobre estas espécies vegetais, que comprovem não só a eficácia e a segurança de sua utilização, como também promove o estímulo do desenvolvimento de sua cadeia produtiva. Considerando estes produtos naturais e as atividades terapêuticas comprovadas cientificamente e que os povos tradicionais além de usarem as plantas como possíveis agentes terapêuticos, eles praticavam ainda a associação de duas ou mais plantas numa só composição para um produto tradicional terapêutico. Considerando também as terapias sinérgicas e associativas das composições medicinais, propomos então os estudos de segurança e eficácia para o desenvolvimento e produção de um fitomedicamento a base da copaíba, andiroba e jucá que promova um efeito antibacteriano. Atualmente ainda não existe no Brasil nenhum fitomedicamento a base dessas plantas associadas com atividade antimicrobiano. Neste sentido, nossa

proposta é desenvolver uma inovação terapêutica a base de uma associação de três plantas (andiroba, copaíba e jucá) de uso tópico que seja seguro, eficaz e que valorize os saberes tradicionais, e adicionalmente contribua para o uso de nossa biodiversidade e o desenvolvimento amazônico sustentável no contexto da bioeconomia.

4. OBJETIVO

Objetivo geral

- Pesquisa, Desenvolvimento e obtenção de uma formulação de um fitoterápico tópico com ação antimicrobiana a partir das espécies *Copaifera reticulata*, *Carapa sp* e *Libidibia ferrea*.

Objetivos específicos

- Realizar a caracterização química do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, e dos extratos etanólicos da *Libidibia ferrea* e do resíduo da *Carapa sp*.
- Realizar ensaios pré-clínicos de segurança: toxicidade oral aguda, toxicidade dérmica aguda (ratos), Toxicidade dérmica em doses repetidas, irritação ocular *in vitro* e a atividade citotóxica.
- Realizar ensaios pré-clínicos de eficácia da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo-resina de *Copaifera reticulata* e dos extratos etanólicos do resíduo da *Carapa sp*. e extratos das vagens do *Libidibia ferrea*.
- Obter e caracterizar uma formulação contendo o óleo-resina de *Copaifera reticulata* e dos extratos etanólicos do resíduo da *Carapa sp*. e das vagens do *Libidibia ferrea*.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Animais

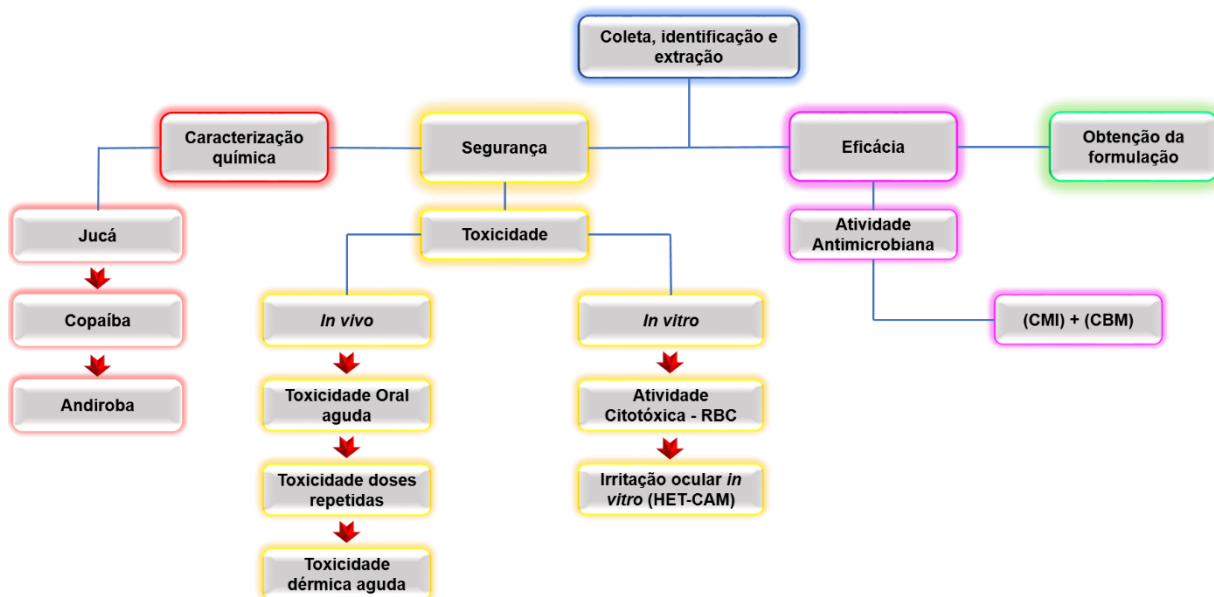
Serão utilizados ratos albinos *Wistar* de ambos os sexos, com idade inicial de 60 dias e com peso médio entre 160 e 250 gramas de massa corporal, provenientes do Biotério da Universidade do Estado do Pará, Campus Santarém. Já os camundongos, serão utilizados 60 animais da linhagem *BalbC* com peso entre 25-40 g, idade acima de 60 dias e também provenientes do Biotério da Uepa, Campus Santarém. Os animais serão mantidos com condição constante de umidade (50 - 60%), temperatura ($21^{\circ}\text{C} \pm 2$) e ciclo circadiano de 12 horas. Serão alimentados com ração e água *ad libitum* durante todo o período experimental. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal da Universidade Federal do Oeste do Pará (CEUA – UFOPA) sob o protocolo de número 0320220198 na data 09/05/2022 (ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais).

Depois de realizada a eutanásia dos animais de acordo com a Resolução Normativa Nº 37, de 15 de fevereiro de 2018 (Concea, 2016), a carcaça e demais resíduos biológicos oriundos deste processo, foram acondicionados em saco plástico branco e descartados conforme o Plano de Gestão de Resíduos em Serviço de Saúde da UFRGS, de acordo com a RDC 306 de 2004.

5.2. Desenho Experimental

Após a coleta e extração dos materiais vegetais, foi realizado a caracterização química dos produtos naturais. Em seguida, procedeu-se aos ensaios de toxicidade pré-clínico *in vivo* e *in vitro*. Após essas determinações, foi realizado a pesquisa da atividade antimicrobiana, antiinflamatória e cicatrizante, conforme o fluxograma a seguir (Figura 13).

Figura 13 - Fluxograma dos estudos experimentais.



Fonte: O autor.

5.3. Coleta, identificação e extração do Material Vegetal

5.3.1. Andiroba (*Carapa sp.*)

O resíduo industrial da andiroba (RIA) foi fornecido pela empresa extratora de óleo vegetal AmazonOil localizada na cidade de Ananindeua-PA, que utilizou a prensagem através do *expeller*. O resíduo foi encaminhado para a Universidade Federal do Oeste do Pará para realizar a extração por solvente alcoólico.

Para a obtenção do extrato o resíduo foi moído para reduzir em partículas menores e em seguida foi levado a estufa à 37°C. Em seguida pesou-se 200 g do resíduo da andiroba, colocou-se em um saco de papel de filtro e se acoplou no soxhlet, conforme figura abaixo (Figura 14). No balão do aparelho, foi adicionado 500 ml de álcool etílico absoluto 96° GL previamente destilado sob hidróxido de sódio. O ciclo de extração durou 8 horas ininterruptas e o processo de evaporação do solvente se deu em um evaporador rotativo.

Figura 14 - Obtenção do extrato etanólico do resíduo da andiroba em soxhlet.

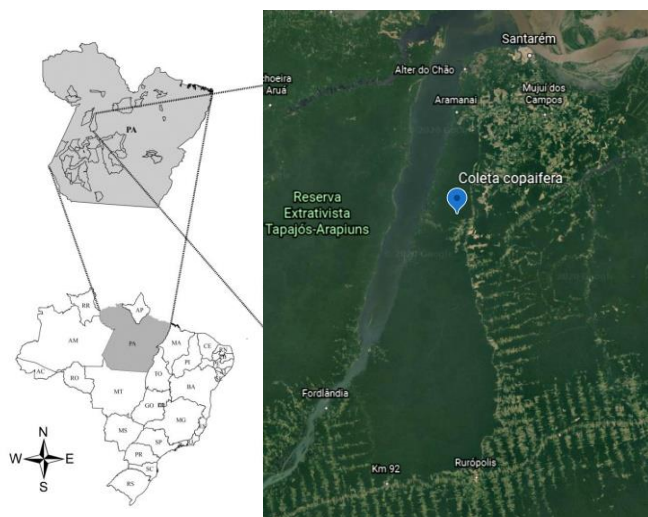


Fonte: O autor.

5.3.2. Copaíba (*Copaifera reticulata*)

O material vegetal para identificação de *Copaifera reticulata* (OCR), utilizado nos testes, foi coletado na Floresta Nacional do Tapajós - FLONA, no quilômetro 67, localizada no município de Belterra (Figura 15), estado do Pará, entre as coordenadas geográficas de 3° 4' 17" S e 54° 59' 32.31" O, altitude de 165,23 m. Foi realizada a identificação botânica e uma exsicata foi depositada no herbário da Embrapa oriental – NID: 69/2011.

Figura 15 - Mapa de localização da região de coleta das árvores de *Copaifera reticulata*.



Fonte: Adaptado de SANTOS, CAMARGO, OLIVEIRA JUNIOR (2018).

A extração do óleoresina foi realizada em período chuvoso e método foi o mesmo descrito em Oliveira, Lameira e Zoghbi (2006). Estas informações podem ser conferidas na Figura 16 (OLIVEIRA et al., 2016).

Figura 16 - Extração do óleorresina de *Copaifera reticulata*.



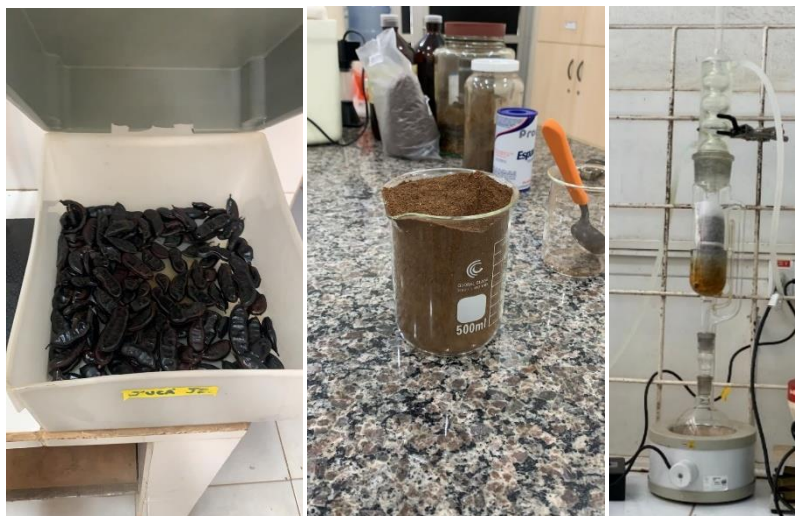
Fonte: O autor.

5.3.3. Jucá (*Libidibia ferrea*)

O material vegetal para identificação de *Libidibia ferrea* (Martius Ex Tulasne) LP Queiroz var. *ferrea*, a ser utilizado nos testes, foi coletado na área urbana de Santarém (Pará-Brasil), sob as coordenadas 2°25'20 "S e 54°42'14" W. Suas exsicatas com Folhas, frutos e flores foram depositadas no Herbário da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA), onde foi catalogada com exsicata número HSTM010436.

Para o processo de extração do extrato, pesou-se 200 g de vagens moídas, peneiradas e secas do jucá, colocou-o em um saco de papel de filtro e acoplou no soxhlet, conforme figura abaixo (Figura 17). No balão do aparelho, foi adicionado 500 ml de álcool etílico absoluto 96° GL previamente destilado sob hidróxido de sódio. O ciclo de extração durou 8 horas ininterruptas e o processo de evaporação do solvente se deu em um evaporador rotativo.

Figura 17 - Extração do extrato de Jucá.



Fonte: O autor.

5.4. Caracterização química

5.4.1. Caracterização química do extrato etanólico do resíduo da *Carapa* sp. óleorresina de *Copaifera reticulata* por cromatografia gasosa acoplada ao espectrometro de massas

As análises cromatográficas foram realizadas em cromatógrafo gasoso (Thermo Scientific) com detector de massas (CG-MS), equipado com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m). Os óleos de copaíba (2,5 mg.mL⁻¹) foram solubilizados em diclorometano destilado e inseridos no sistema cromatográfico (1 μ L) em modo Split, (1:50) numa vazão de 2 mL.min.⁻¹. Os constituintes químicos foram ionizados por impacto de elétrons com energia de 70 eV, num sistema quadrupolo com varredura de 40 a 400 uma. A programação da temperatura da coluna foi inicialmente de 80,0 °C a 145,0 °C, com taxa de aquecimento de 2,0 °C/min e posteriormente, de 145 °C a 280 °C com taxa de aquecimento de 6 °C/min, com isoterma final de 10 minutos. As temperaturas do injetor, da fonte de íons e linha de transferência foram de 220 °C, 260 °C e 280 °C, respectivamente.

5.4.2. Caracterização química do extrato etanólico do resíduo das Andiroba e das vagens Jucá por UPLC-MS/MS

A caracterização química do extrato etanólico das vagens do jucá e do resíduo da prensagem da Andiroba, foi realizada em parceria com a Universidade de São Paulo.

Os extratos brutos (1,0 mg) foram solubilizados em 1,0 mL de metanol (grau HPLC) obtendo-se uma concentração de 1,0 mg/mL. A solução estoque foi diluída para obter uma concentração final de 100 µg/mL, e posteriormente, analisada em um sistema ACQUITY UPLC *H-Class* (Waters Corporation) de cromatografia líquida de ultra-performance (UPLC) acoplado aos detectores de arranjo de diodos (DAD, *do inglês*, Diode Array Detector) e ao espectrômetro de massas Xevo TQ-S tandem quadrupole (Waters Corporation, Milford, MA) operando com uma fonte de ionização por eletrospray (ESI-MS) em modo positivo e negativo de análise. Um volume de 5 µL de amostra foi injetada em uma coluna Ascentis® Express C₁₈ (100 x 4,6 mm, 2,7 µm o diâmetro da partícula) da Supelco. A fase móvel consistiu de 0,1% de Ácido Fórmico (solvente A) e Acetonitrila contendo 0,1% de ácido fórmico (solvente B). A separação dos compostos foi realizada em modo gradiente de 10 a 90% de B, o qual permaneceu por 1 min a 90% de B, e em seguida, retornou as condições iniciais (10% de B) nos próximos 5 min a uma taxa de fluxo de 300 µL/min. O tempo total de análise foi de 26 min. Os compostos foram monitorados no DAD na faixa de 220 a 600 nm. Os parâmetros de operação utilizados na fonte ESI foram: voltagem do capilar = 3,2 kv (modo positivo) 2,5 kv (modo negativo), voltagem do cone = 40 V, temperatura da fonte de ESI = 150 °C, fluxo do gás de dessolvatação = 700 L/h, temperatura do gás de dessolvatação = 300 °C. A faixa de massas usada no modo de análise *Full-scan* foi de 150 a 1200 Da.

A análise por UPLC-MS/MS foi realizada por Dissociação Induzida por Colisão (DIC) utilizando argônio com gás de colisão, e diferentes energias (E_{lab}) foram utilizadas para cada íon precursor protonado $[M+H]^+$ e desprotonado $[M-H]^-$.

5.5. Ensaios de Segurança - Toxicidade

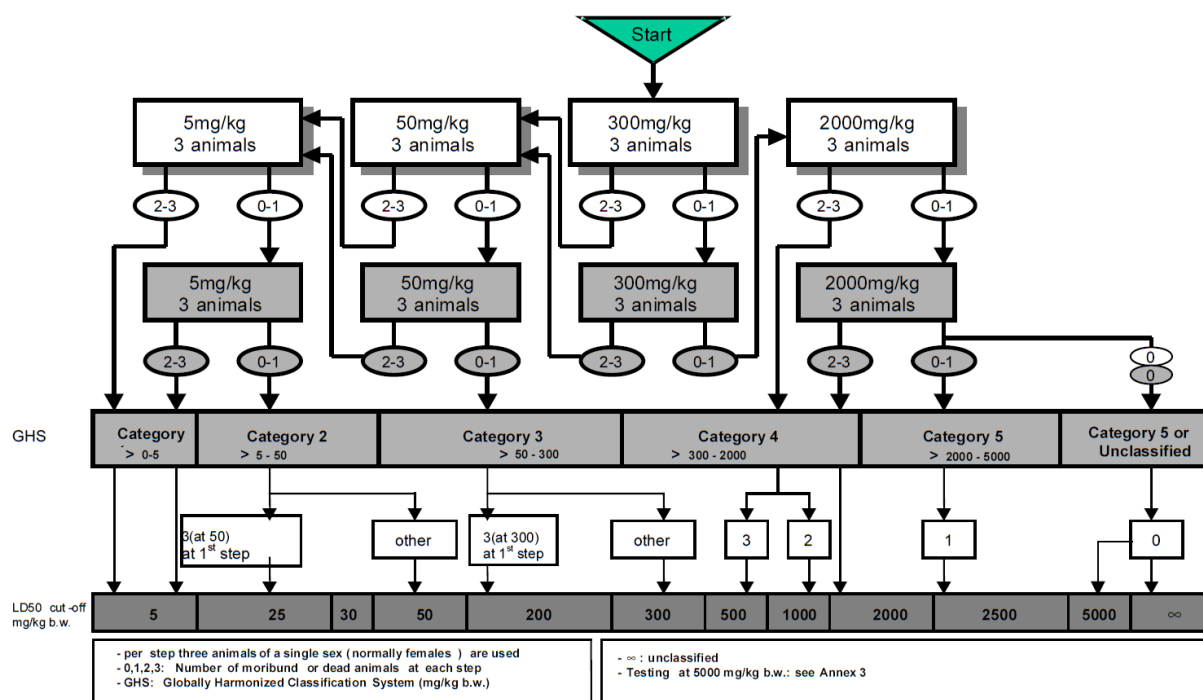
Os testes de toxicidade serão realizados com base nas diretrizes da The Organization for Economic Co-operation and Development (OECD), Resolução Nº 26 de 13 de maio de 2014 da Anvisa e o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica (ANVISA, 2014c).

5.5.1. Toxicidade oral aguda

Este método consiste na administração por sonda gástrica utilizando um tubo estomacal o óleo-resina da *Copaifera reticulata* e os extratos etanólicos do resíduo da *Carapa sp.* e das vagens da *Libidibia ferrea*, diluídos em Tween 80 à 1% veiculado em NaCl 0,9%, em uma dose inicial única de 2.000 mg/kg de massa do animal, inicialmente em grupo de 3 indivíduos, e depois mais 3 animais para confirmar o resultado anterior (Figura 18 - Fluxograma da Toxicidade Aguda).

Após a administração da dose dos três produtos naturais, os animais foram observados individualmente pelo menos uma vez a cada 30 minutos nas quatro primeiras horas, periodicamente durante as primeiras 24 horas, e diariamente a partir de então até um total de 14 dias. Os parâmetros observados, com possíveis reações tóxicas, foram alterações na pele, pêlos, olhos e mucosas, sinais de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, coma, dor e sofrimento, além do tempo de início e duração do período de recuperação (OECD 423, 2002).

Figura 18 - Fluxograma da Toxicidade Aguda.



Fonte: (OECD 423, 2002).

5.5.2. Toxicidade dérmica aguda em ratos

A realização deste teste foi de acordo com o preconizado pelo protocolo da OECD 402 (2017), qual regulamenta a metodologia de Toxicidade Dérmica aguda em

ratos. Este protocolo também está contemplado no “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” da Anvisa (2013).

Inicialmente foi utilizado 1 animal por grupo na dose de 2000 mg/Kg de peso corporal devido aos resultados obtidos na Toxicidade Oral Aguda de cada produto testado, óleo-resina de *Copaifera reticulata*, extrato etanólico do resíduo da *Carapa* *sp.* e extrato etanólico das vagens de *Libidibia ferrea*.

No dia anterior à administração das drogas em estudo, os animais foram anestesiados com Quetamina (80 mg/Kg, i.p.) e Xilazina (10 mg/kg, i.p.), para a realização da epilação. No dia do experimento, as drogas foram solubilizadas em Tween 80 à 1% em água destilada e aplicadas uniformemente sobre uma área de aproximadamente 10% da superfície total do corpo (aproximadamente 40 cm²). Sendo mantida em contato com a pele com uma gaze porosa e fita não irritante ao longo de 24 horas. Após esse período, os resíduos da substância foram removidos com solução salina estéril (Figura 19). O local de tratamento foi observado 24, 48 e 72 horas após a remoção do produto químico em estudo usando os critérios de Draize (Tabela 1).

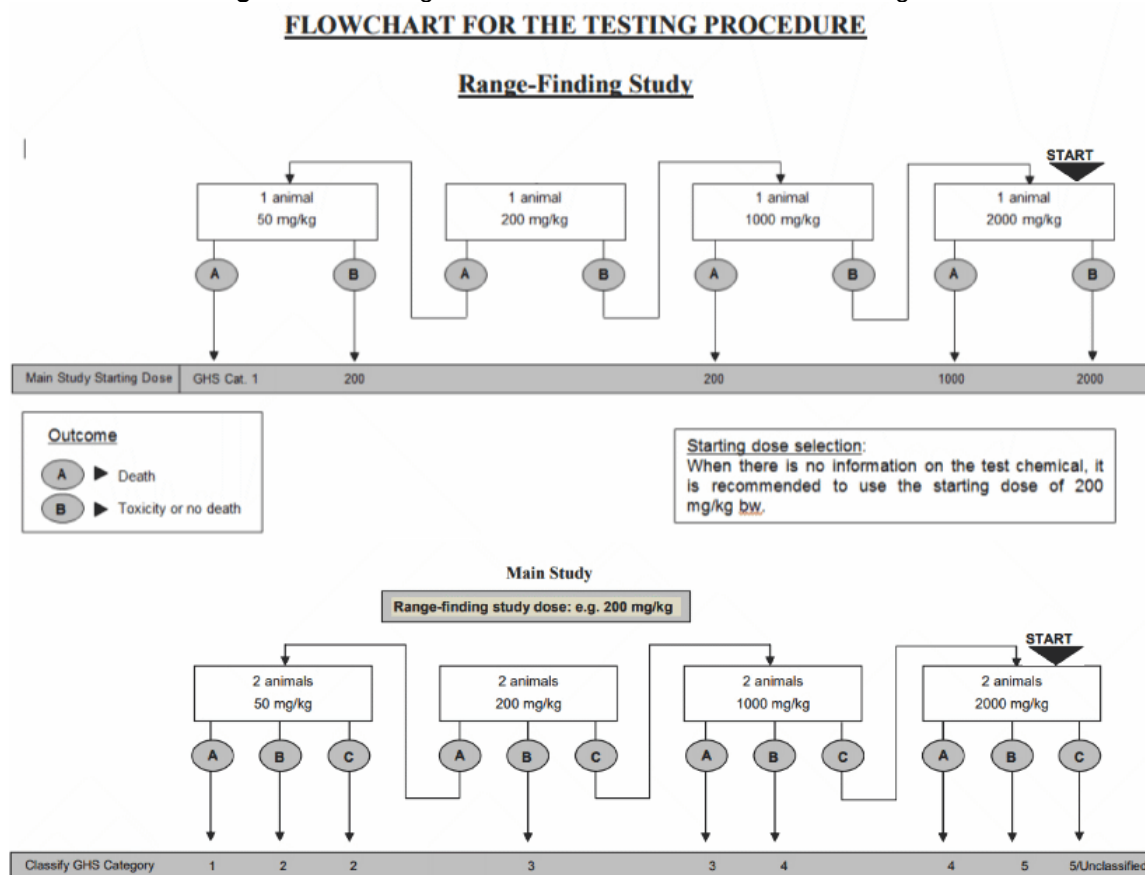
O período de observação foi de 14 dias, pelos mesmos parâmetros do teste anterior (OECD 423). Após constatado o não aparecimento de sinais tóxicos, o experimento foi repetido com 2 animais por grupos para confirmação da atividade, conforme o Fluxograma disposto na Figura 20.

Figura 19 - Teste de Toxicidade dérmica aguda. (A) Rato Wistar com a droga aplicada na região dorsal do animal. (B) Rato Wistar após a remoção da substância teste.



Fonte: O autor.

Figura 20 - Fluxograma do teste de Toxicidade dérmica aguda.



Fonte: (OECD 402, 2017)

Tabela 1 - Grau de reação da pele, segundo os critérios de Draize (1944).

FORMAÇÃO DE ERITEMA E ESCARAS		Grau
Sem eritema		0
Eritema muito leve (pouco perceptível)		1
Eritema bem definido		2
Eritema moderado a severo		3
Eritema grave severo a formação de escaras		4
FORMAÇÃO DE EDEMA		Grau
Sem edema		0
Edema muito leve (pouco perceptível)		1
Edema leve (bordas bem definidas)		2
Eritema moderado (aumento superior de aproximadamente 1mm)		3
Eritema severo (aumento superior a 1mm e estendendo além da área de exposição)		4

Fonte: Draize (1944).

5.5.3. Toxicidade dérmica em doses repetidas *in vivo*

A realização deste teste foi baseada nas normas do “Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos” da Anvisa (2013) e da OECD 410 (1981).

Os grupos foram constituídos por 5 machos e 5 fêmeas de ratos, sendo um grupo controle (Tween 80 à 1%), grupo óleo-resina de *C. reticulata*, grupo extrato etanólico do resíduo de *Carapa sp* e grupo extrato etanólico das vagens de *L. ferrea*. Nesses grupos tratados com drogas naturais veiculadas em Tween 80 à 1%, foram criados subgrupos tratados com doses de 1.000, 250 e 62,50 mg/Kg. No total, foram utilizados 80 animais.

Durante o experimento, os animais foram observados e registradas as alterações comportamentais (diariamente) e variação do peso corpóreo (semanalmente). Ao fim dos estudos, os roedores foram eutanasiados com hiperdose de quetamina (180 mg/kg, i.p.) e xilazina (30 mg/kg i.p) e analisado o Hemograma completo, bioquímica do sangue (albumina, cálcio, cloreto, creatinina, fósforo, glicose, proteínas totais, aminotransferases e ureia), exames anatomopatológicos (macroscópicos dos órgãos), coleta dos órgãos (fígado, rim, pulmão, coração, estômago, intestino grosso e delgado, testículo, pâncreas, pele tratada e pele normal) para serem avaliados macroscopicamente. Já a análise histopatológica foi realizada nos animais tratados com a maior dose e no grupo controle.

Para o cálculo da superfície corporal, adotou-se a fórmula de Meeh que é descrita por Venter et al. (2015) e se dá pela seguinte equação:

$$A = 10.W^{2/3}$$

onde:

A = área em cm²,

10 = Uma constante e

W = gramas de peso

5.5.4. Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda *in vitro*

Serão utilizados ovos embrionados de galinha (*Gallus gallus domesticus*) recolhidos no primeiro dia da fertilização que serão adquiridos em uma granja localizada na zona rural da cidade de Santarém (Pará). O peso médio dos ovos foi de

50 – 60 gramas. O método proposto foi o preconizado pela ICCVAM (2010) e adaptado por Derouiche & Abdenmour (2017). Os ovos foram introduzidos em uma incubadora com temperatura controlada de $38,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$, umidade relativa de 70% e, no décimo dia de incubação, o ovo é aberto cortando a casca para o lado onde a câmara de ar está localizado. No décimo dia, será adicionado 0,3 ml de solução fisiológica 0,9% na membrana interna para hidratação e aguardar por 30 minutos. Decorrido esse tempo, será retirado cuidadosamente o excesso de soro fisiológico e, em seguida, será removida para expor a membrana cório-alantóide (CAM). Após esse procedimento, será adicionado sobre a CAM 300 μL da substância a ser testada em cada um dos ovos (Controle Positivo NaOH 0,1N, Controle Negativo NaCl 0,9%, óleorresina de *C. reticulata* 1.000 mg/mL, extrato etanólico de *L. ferrea* 62,50 mg/mL solubilizado em solução salina 0,9% e o extrato alcoólico do resíduo de *Carapa sp.* 125 mg/mL, também solubilizado em soro fisiológico), conforme Figura 21. Todo o experimento de abertura e observação deverá ser realizado num ambiente seguro, limpo e praticamente estéril, como a capela de fluxo laminar.

No decorrer dos 5 minutos de observação, foram analisados o comportamento dos vasos sanguíneos e o tempo de aparecimento de um dos três pontos finais a serem observados, que são sinais são: lise vascular (desintegração do vaso sanguíneos), hemorragia (sangramento dos vasos) e a coagulação (desnaturação proteica intra e extravascular). Com o objetivo de garantir resultados reprodutíveis e com alta confiabilidade, utilizamos fotografias de referência para todos os pontos finais.

A avaliação tem como base o surgimento de cada um dos três pontos de extremidade do HET-CAM em intervalos de tempo fixos de 30 segundos, 2 minutos e 5 minutos (DEROUCHE; ABDENNOUR, 2017). O tempo para lise, hemorragia e coagulação recebem uma pontuação específica de acordo com o tempo em que cada evento acontece. Esta relação pode ser observada na Tabela 2.

Em seguida, as pontuações foram somadas obtendo um valor numérico único, evidenciando a capacidade de irritação da formulação testada em uma escala comum que varia de 0 a 21, demonstrada na Tabela 3 (ICCVAM, 2010). O teste deve ser realizado em 5 ovos e, com os resultados obtidos, determina-se uma média (entre 0 a 21), indicado as categorias irritantes e não-irritante (Tabela 2) (DEROUCHE; ABDENNOUR, 2017).

Tabela 2 - Esquema de pontuação para testes de irritação com o método de teste.

Efeitos	Pontuação		
	0,5min (30s)	2min (120s)	5min (300s)
Lise	5	3	1
Hemorragia	7	5	3
Coagulação	9	7	5

Fonte: ICCVAM (2010) e adaptado por Derouiche & Abdenmour (2017).

Tabela 3 - Categoria de irritação de acordo com a faixa de pontuação do HET-CAM.

Faixa de pontuação	Categoria de irritação
0 a 0,9	Não rotulado
1 a 4,9	Ligeira irritação
5 a 8,9	Irritação moderada
9 a 21	Irritação grave

Fonte: ICCVAM (2010) e adaptado por Derouiche & Abdenmour (2017).

Figura 21 - Procedimento experimental em sequência para desenvolvimento do método HET-CAM.



Fonte: Fernández-Ferreiro et al. (2014).

5.5.5. Citotoxicidade

5.5.5.1. RBC – Red blood cell

Para a realização deste teste de citotoxicidade, foi utilizado a metodologia proposta por Ahmad et al. (2010) e Pagano & Faggio, (2015). Este método está descrito no Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (Anvisa, 2012). O experimento teve início com a coleta de 5mL de Sangue fresco intracardíaco de ratos Wistar em tubo com EDTA e centrifugado a 1.500 rpm no decorrer de 5 min à 4° C. O sobrenadante foi retirado, o pellet com as células vermelhas do sangue (RBC) foi lavado cinco vezes com solução salina 0,9% estéril e depois ressuspensas na mesma solução para obter uma solução de hemácias 2% (v/v). As drogas testes foram diluídas em solução de Tween a 1%, testado nas concentrações de 2.000 até 15,6 µg/ml, em 8 diluições seriadas (1:2) testados em triplicata. Foram adicionados em cada poço 100ul da diluição da droga (2 mg/mL) e adicionado 100µL da suspensão

de hemácias a 2% (v/v). As suspensões resultantes foram incubadas sob agitação durante 60 minutos a 37 ° C. Após a incubação, as amostras foram centrifugadas durante 10 min a 1500 rpm. Os sobrenadantes foram transferidos para placas de 96 poços e a liberação de hemoglobina foi medida por absorbância a 450 nm, utilizando o leitor multiplacas BioTek Synergy HT. Para controle de 100% de hemólise foi feita uma suspensão de hemácias com Triton X-100 1% (v/v). Como controle sem hemólise, utilizou-se solução salina 0,9%.

O percentual de hemólise foi determinado pela seguinte equação:

$$\% \text{ Hemólise} = \frac{(\text{Abs 450nm tratados amostra} - \text{Abs 450nm não tratada}) \times 100}{(\text{Abs 450nm 1\% Triton X-100} - \text{Abs 450nm não tratada})}$$

O grau de citotoxicidade *in vitro* da atividade citotóxica na membrana plasmática de eritrócitos foi avaliado usando a taxa de mortalidade observada:

- 0% a 9% = não tóxico;
- 10% a 49% = levemente tóxico;
- 50% a 89% = tóxico; e
- 90% a 100% = altamente tóxico.

5.6. Ensaios de Eficácia - Avaliação da atividade antimicrobiana

5.6.1. Microorganismos e condições de cultivo

Para a avaliação da atividade antimicrobiana do óleorresina da *C. reticulata*, do extrato etanólico do resíduo da *Carapa spp.* e da *Libidibia ferrea*, foram selecionadas as bactérias *Pseudomonas aeruginosa* (CCCD P003), *E. coli* (ATCC 25922), *S. aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228) e *S. pyogenes* (ATCC 19615) frequentemente associadas à infecções em soluções de descontinuidade da pele. Estas cepas foram adquiridas na forma liofilizada da empresa Cefar Diagnóstica, da linha “Coleção de Culturas da Cefar Diagnóstica (CCCD), em São Paulo, Brasil.

Preliminarmente, as cepas liofilizadas foram hidratadas em caldo enriquecido e nutritivo, Mueller Hinton (MHA), à 37°C no decorrer de 24 horas.

5.6.2. Método de microdiluição em caldo - Determinação da concentração inibitória

mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) (CLSI, 2006).

Neste método, a concentração inicial utilizada para o óleo-resina de *C. reticulata* foi de 500 mg/mL e o extrato etanólico dos resíduos da *Carapa spp.* e das vagens da *Libidibia ferrea* foi 250 mg/mL. Dessas soluções, foram realizadas sucessivas diluições em série, utilizando Caldo Mueller-Hinton (MHB) como diluente. Em seguida, o inóculo bacteriano foi inicialmente ajustado ao padrão 0,5 da escala de MacFarland, com posterior diluição em solução salina estéril (fator de diluição de 1:10), para obtenção da concentração final de $1,5 \times 10^4$ UFC mL⁻¹. Posteriormente, adicionou-se 10 µL da suspensão bacteriana em cada poço da placa de 96 poços, no qual já continha 90 µL da concentração das drogas em estudo com suas respectivas concentrações e 90 µL de MHB estéril. A droga padrão de escolha Ampicilina, foi diluída em solução tampão fosfato de sódio, para obtenção de concentrações, variando de 2 a 256 µg mL⁻¹ (fator de diluição de 1:1). Realizou-se simultaneamente o controle de viabilidade das cepas, o controle de esterilidade do meio e o controle de atividade do solvente. Cada poço comportou volume final de 100 µL.

Em seguida, as placas foram incubadas em estufa bacteriológica com controle de temperatura em $37 \pm 2^\circ\text{C}$, no decorrer de 24 horas. Após esse período, a inibição do crescimento bacteriano foi revelada por adição de solução aquosa de resazurina (20 µL, 0,02%, p/v) e re-incubação por mais 3 horas. A CIM, definida como a menor concentração das drogas testadas que são capazes de inibir o crescimento de microorganismos, foi determinada pela observação da cor azul em cada poço da placa. Já quando ocorre a mudança da coloração azul para rosa, em decorrência da redução da resazurina à refazurina, indica o crescimento de células viáveis que conseguiram metabolizar o corante. Nos poços da placa que apresentaram crescimento bacteriano visualmente, estes foram selecionados para avaliar a CBM que foi determinada pela ausência de crescimento microbiano após subcultura em placas contendo MHA. Os testes foram realizados em triplicata.

5.7. Obtenção da formulação semissólida a base de manteiga de *Astrocaryum murumuru* Mart. contendo óleorresina de *Copaifera reticulata* e os extratos etanólico de *Carapa sp.* e *Libidibia ferrea*.

Os produtos naturais oriundos de plantas medicinais podem ser veiculados em formulações farmacêuticas de uso na pele e mucosa, como pomada e creme. Esses produtos são constituídos por preparações semissólidas, com consistência mole e destinadas ao uso na pele e mucosas. A formulação quando finalizada, deve possuir plasticidade para poder modificar sua forma com a força exercida com a aplicação do produto e se molde ao relevo do local (BORELLA et al., 2010). Posto isso, foi selecionado uma base farmacêutica contendo a manteiga de murumuru, que atribui a formulação um sistema emulsionado, biodegradável, biocompatível e capaz de liberar ativos terapêuticos de caráter lipo e hidrofílico na pele e cavidades de mucosas (BR 102015030888-4).

O “Murumuru” (*Astrocaryum murumuru* Mart., Arecaceae) é uma palmeira nativa da região Amazônica que produz sementes oleaginosas das quais se extrai um óleo fixo (manteiga de “murumuru”), que apresenta capacidade em substituição a alguns excipientes farmacêuticos. Essa manteiga é rica em ácidos graxos como láurico, mirístico e oleico e é utilizada na indústria cosmética. A natureza anfifílica da manteiga de “murumuru” fornece um sistema de entrega tópica com a ocorrência de uma fase líquida cristalina que pode ser obtida na presença de quantidades adequadas de água e tensoativos. Esse sistema é biodegradável, biocompatível e de fácil aplicação, permitindo a incorporação de fármacos com diferentes coeficientes de partição ($\log P$) em sua matriz (SILVA et al., 2021a).

Para o preparo das formulações foi realizada a fusão da fase oleosa (manteiga de murumuru, óleorresina de copaíba, extrato etanólico de jucá e do resíduo de andiroba) e tensoativo Span 60 a $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5$, seguido da adição da fase aquosa na mesma temperatura (NUNES et al., 2016). Em seguida, as formulações foram mantidas em repouso por 24h em temperatura ambiente para atingir o equilíbrio.

5.7.1. Identificação de fase mesomórfica por microscopia de luz polarizada (MLP)

Após 24 horas do preparo, as formulações foram colocadas sobre lâmina de vidro, cobertas com lamínula e submetidas à microscopia de luz polarizada em microscópio da marca Leica DM750 (Leica, Alemanha) acoplado com uma câmera

digital, para a identificação do comportamento de birrefringência de fase mesomórfica das formulações (ABRAHAM; CHAN; PARK, 2020).

5.8. Análise de dados

Os resultados foram expressos como médias $\pm$ Desvio Padrão (D.P.) ou Erro Padrão Médio (E.P.M) dos respectivos índices analisados. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas com análise de variância (ANOVA) seguida pelos testes *post hoc* de Tukey, quando necessário. Valores de *p* menores que 0,05 foram considerados indicativos de significância. A análise estatística foi realizada no software Graph Pad Prism® versão 5.00, direitos autorais pertencentes à Graph Pad Software®.

6. RESULTADOS

6.1. Extração de produtos naturais

6.1.1. *Carapa sp*

Na extração do óleo do resíduo de andiroba com o solvente etanol em soxhlet durante um percurso de 8 horas, o rendimento bruto obtido foi de 52 g de um total de 200 g de matéria bruta inicial. Assim, o percentual de rendimento foi de 26%.

6.1.2. *Copaifera reticulata*

O processo de hidrodestilação para fracionamento do óleorresina de *Copaifera reticulata* foi realizado por arraste a vapor em sistema de destilação simples num processo que durou cerca de 30 horas de extração intervaladas. Das 100 gramas do óleorresina adicionados ao balão de fundo redondo, renderam cerca de 39 g de resina (diterpenos – 39%) e 61g de óleo essencial (sesquiterpenos – 61%).

6.1.3. *Libidibia ferrea*

No processo de obtenção do extrato de jucá através do aparelho de soxhlet por refluxo em etanol num processo intermitente por 8 horas, o rendimento foi de 47 g do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* compreendendo a um percentual de 23,5% da matéria bruta inicial das vagens moídas.

6.2. Caracterização Química

6.2.1. Andiroba (*Carapa sp.*)

6.2.1.1. Caracterização química da Andiroba por UPLC-MS/MS

Assim, a caracterização química do extrato alcoólico do resíduo de andiroba foi realizada pela Dissociação Induzida por Colisão (DIC) no aparelho UPLC-MS/MS. Logo, a identificação sugere a presença dos compostos marcados na figura 22 com o espectro do cromatograma e, na Figura 23, a representação molecular das moléculas identificadas. Na respectiva análise, consegue-se sugerir a identificação dos constituintes presentes na amostra, sendo eles o ácido gálico, ácido gentisínico, Andirolide S, Andirolide B, ácido copálico, 6,7-dihidroflavopereirina e o Geissolaevina (12,60%).

Figura 22 - Espectro da cromatografia realizada por UPLC MS/MS da *Carapa sp.*

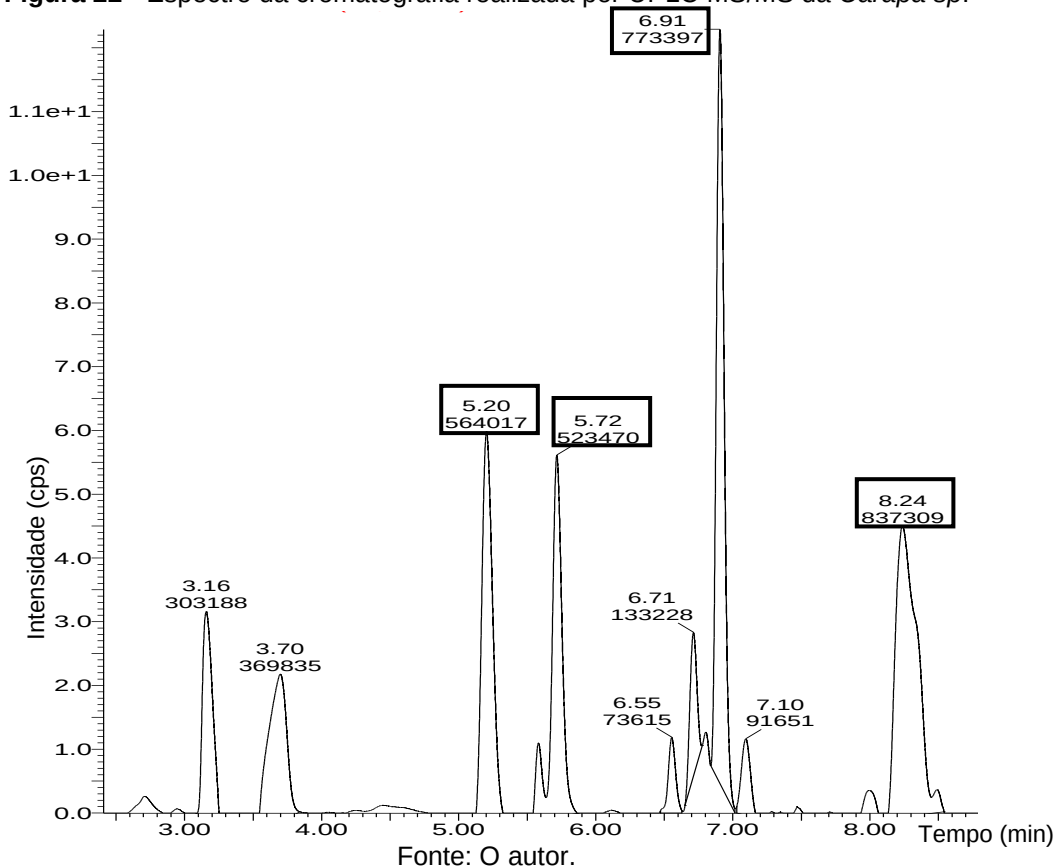
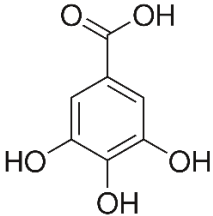
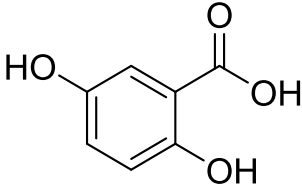
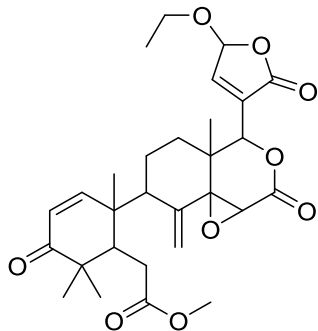
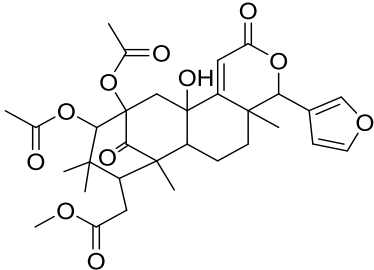
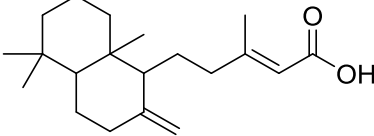
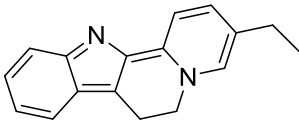
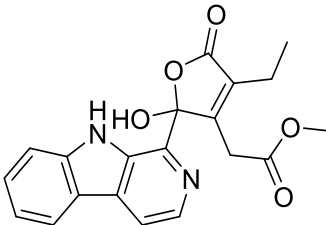


Figura 23 - Os componentes majoritários sugeridos na constituição do extrato etanólico do resíduo da andiroba (*Carapa sp.*), seu percentual na amostra, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos.

<i>Carapa sp.</i>		
 Ácido gálico Fórmula molecular: $C_7H_6O_5$ Massa Molar: 170,02 g/mol Tempo de retenção (min): 5,20	 Ácido gentisínico Fórmula molecular: $C_7H_6O_4$ Massa Molar: 154,03 g/mol Tempo de retenção (min): 5,72	 Andiolide S Fórmula molecular: $C_{29}H_{36}O_9$ Massa Molar: 528,24 g/mol Tempo de retenção (min): 6,90
 Andiolide B Fórmula molecular: $C_{31}H_{38}O_{11}$ Massa Molar: 586,24 g/mol Tempo de retenção (min): 6,90	 Ácido copálico Fórmula molecular: $C_{20}H_{32}O_2$ Massa Molar: 304,24 g/mol Tempo de retenção (min): 6,90	 6,7-dihidroflavopereirina Fórmula molecular: $C_{17}H_{16}N_2$ Massa Molar: 248,13 g/mol Tempo de retenção (min): 6,90
 Geissolaevina Fórmula molecular: $C_{20}H_{18}N_2O_5$ Massa Molar: 366,12 g/mol Tempo de retenção (min): 8,20		

Fonte: O autor.

6.2.1.2. Caracterização química da Andiroba por GC-MS

Os compostos majoritários foram identificados através da comparação dos índices de retenção da amostra obtida com os dados apresentados pela biblioteca Adams (2007). Os resultados foram apresentados em percentual de concentração relativa (%).

Conforme dados apresentados no cromatograma (Figura 24), foram identificados 8 compostos majoritários que correspondem a 66,38% do total bruto identificados nos espectrogramas. Os constituintes que apresentaram concentração e que foram identificados estão apresentados na Figura 25, que são: ácido linoleico (21,14 %), ácido palmítico (15,79 %), ácido oleico (15,12 %), ácido láurico (7,74 %), ácido mirístico (4,23 %), ácido esteárico (1,85 %), ácido caprílico (0,27 %) e ácido cáprico (0,24%).

Figura 24 - Espectro da cromatografia realizada por GC-MS da *Carapa sp.*

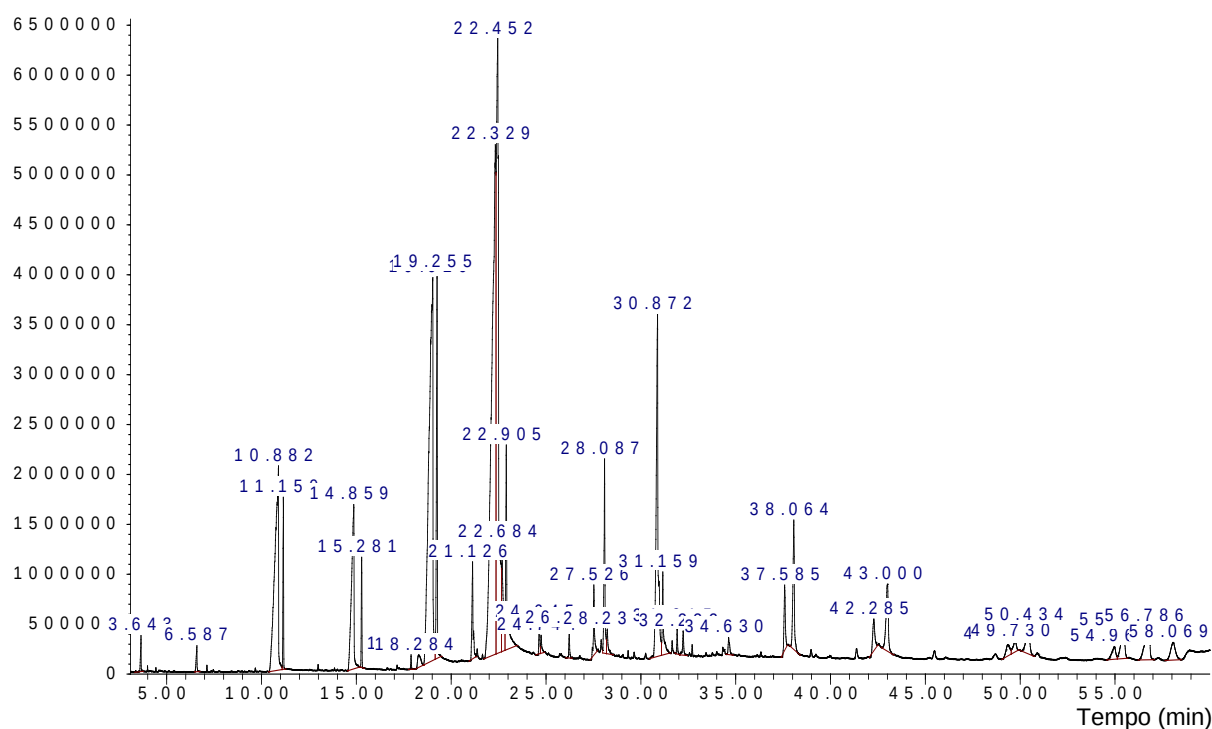
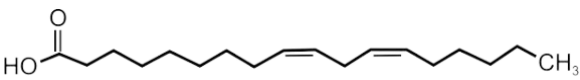
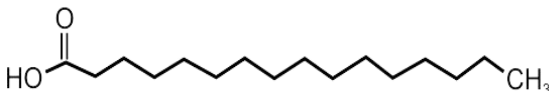
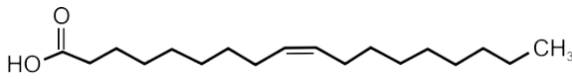
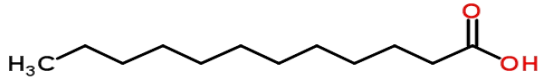
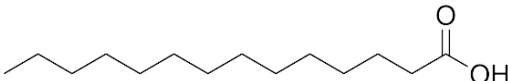
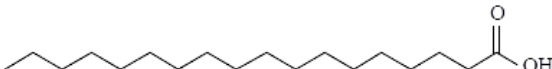
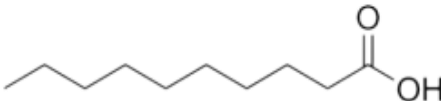


Figura 25 - Os componentes majoritários do extrato etanólico do resíduo da *Carapa sp*, seu percentual, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. O procedimento foi realizado em um cromatógrafo a Thermo Scientific, equipado com detector de massas (CG-MS), com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm). Os constituintes químicos da andiroba foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007).

<i>Carapa sp.</i>	
 Ácido linoleico (21,14 %) Fórmula molecular: C₁₈H₃₂O₂ Massa Molar: 280,45 g/mol Tempo de retenção (min): 22,23	 Ácido palmítico (15,79 %) Fórmula molecular: C₁₆H₃₂O₂ Massa Molar: 256,4 g/mol Tempo de retenção (min): 19,02
 Ácido oleico (15,12 %) Fórmula molecular: C₁₈H₃₄O₂ Massa Molar: 282,47 g/mol Tempo de retenção (min): 22,45	 Ácido láurico (7,74 %) Fórmula molecular: C₁₂H₂₄O₂ Massa Molar: 200,32 g/mol Tempo de retenção (min): 10,88
 Ácido mirístico (4,23 %) Fórmula molecular: C₁₄H₂₈O₂ Massa Molar: 228,37 g/mol Tempo de retenção (min): 14,86	 Ácido esteárico (1,85 %) Fórmula molecular: C₁₈H₃₆O₂ Massa Molar: 284,48 g/mol Tempo de retenção (min): 22,68
 Ácido caprílico (0,27 %) Fórmula molecular: C₈H₁₆O₂ Massa Molar: 144,21 g/mol Tempo de retenção (min): 3,64	 Ácido cáprico (0,24%) Fórmula molecular: C₁₀H₂₀O₂ Massa Molar: 172,26 g/mol Tempo de retenção (min): 6,59

6.2.2. Copaíba (*Copaifera reticulata*)

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007), pela co-injeção de padrões (β -cariofileno e α -humuleno) e por comparação dos perfis de fragmentação obtidos com a espectroteca Wiley 8ª edição. O percentual de cada constituinte foi expresso em valores de concentração relativa (%).

A caracterização dos constituintes químicos presentes na amostra de óleo-resina de *C. reticulata* (OCR) revelou a presença de 12 metabólitos secundários classificados como majoritários na amostra e que são oriundos das copiabeiras compostos. Do quantitativo colocado para análise, apenas 6,85% não conseguiram ser identificados e 93,15% foram identificados, sendo a presença majoritária de sete sesquiterpenos (68,26%) e cinco diterpenos (24,89%). Entre os constituintes 3 cadeias terpênicas, destacam-se os de maiores apresentações: β -cariofileno (39,69%), β -bisaboleno (7,06%), α -humuleno (5,86%), β -selineno (5,34%) e o *trans*- α -bergamoteno (4,9%). Já os metabólitos secundários com 4 cadeias terpênicas têm destaque o ácido cauranoico (9,36%), ácido caurenico (6,33%) e o ácido labda-7,13-dien-15-oico (4,6%). Estes dados estão apresentados no cromatograma da Figura 26 e na Figura 27 que apresenta os componentes majoritários.

Figura 26 –Cromatograma dos compostos químicos presentes no óleo-resina de *C. reticulata*, obtido em GC-MS.

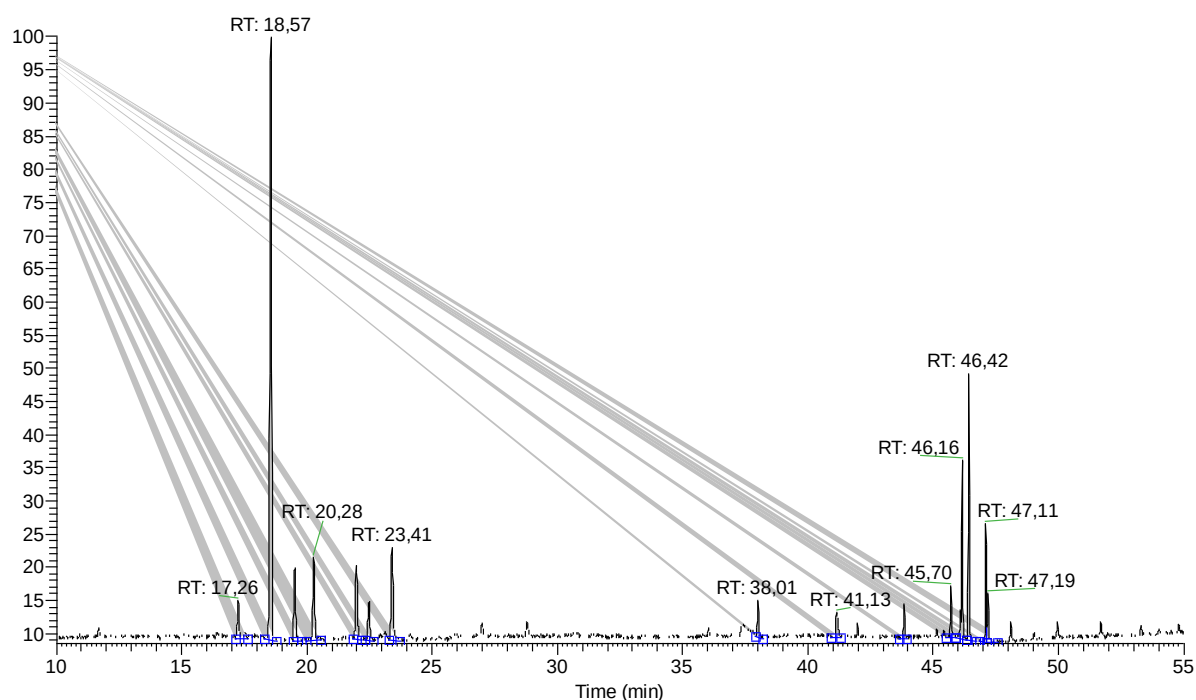
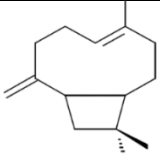
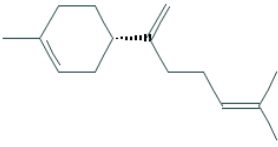
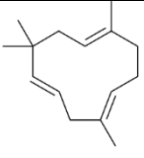
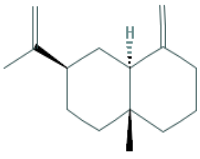
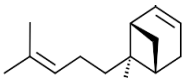
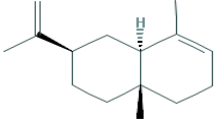
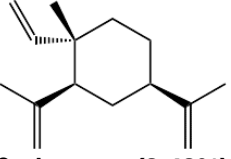
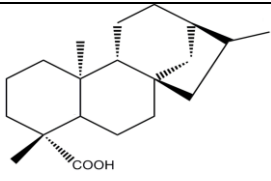
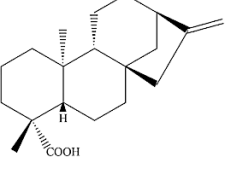
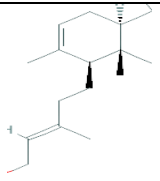
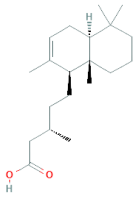
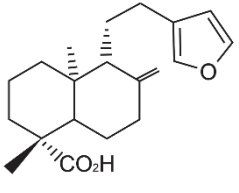


Figura 27 - Os componentes majoritários de óleo-resina de *C. reticulata*, seu percentual, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. O procedimento foi realizado em um cromatógrafo a Thermo Scientific, equipado com detector de massas (CG-EM), com auto-amostrador (TriPlus RSH) e coluna capilar apolar (Tr-5; 30 m x 0.25 mm ID x 0.25 μ m). Os constituintes químicos do óleo-resina foram identificados por comparação dos seus índices de retenção (IR) com a literatura (ADAMS, 2007).

Sesquiterpenos		
 β-cariofileno (39,69%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol	 β-bisaboleno (7,06%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol	 α-humuleno (5,86%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol
 β-selineno (5,34%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol	 Trans-α-bergamoteno (4,9%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol	 α-selineno (2,99%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol
 β-elemeno (2,42%) Fórmula molecular: $C_{15}H_{24}$ Massa Molar: 204 g/mol		
Diterpenos		
 Ácido cauranoico (9,36%) Fórmula molecular: $C_{20}H_{32}O_2$ Massa Molar: 304 g/mol	 Ácido caurenoico (6,33%) Fórmula molecular: $C_{20}H_{30}O_2$ Massa Molar: 302 g/mol	 Ác. labda-7,13-dien-15-oico (4,6%) Fórmula molecular: $C_{20}H_{34}O$ Massa Molar: 290,5 g/mol
 Ácido catívico (2,49%) Fórmula molecular: $C_{20}H_{34}O_2$ Massa Molar: 306,5 g/mol	 Ácido daniélico (2,11%) Fórmula molecular: $C_{20}H_{29}O_3$ Massa Molar: 317.45 g/mol	

Fonte: O autor.

6.2.3. Jucá (*Libidibia ferrea*)

A caracterização química do extrato hidro alcoólico de *Libidibia ferrea* resultou na identificação do ácido elágico, galotanino, ácido gálico, dilactona ácido valoneico (figura 28 e 29).

Figura 28 - Cromatograma dos compostos químicos presentes no extrato etanólico de *L. ferrea* obtido em UPLC-MS/MS.

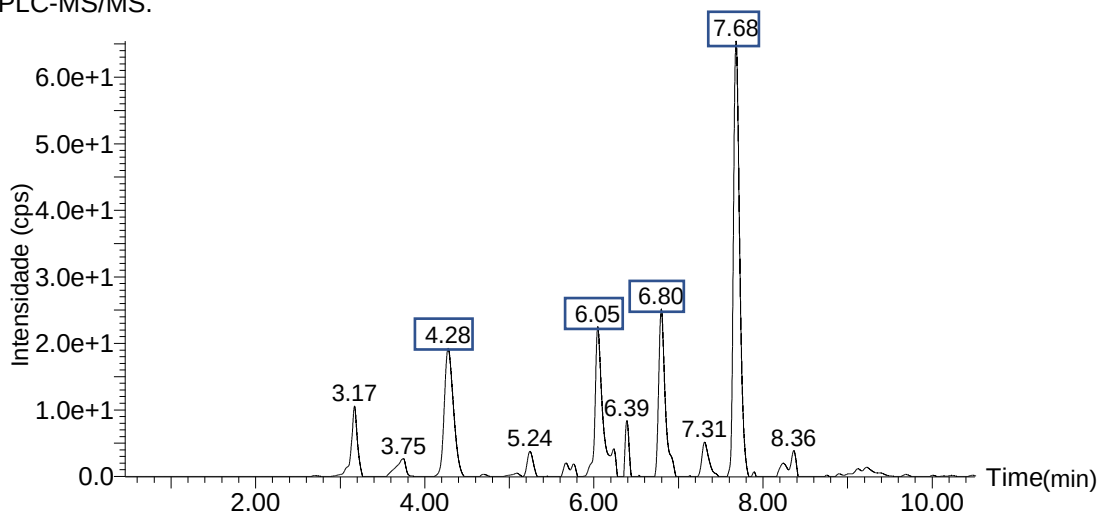
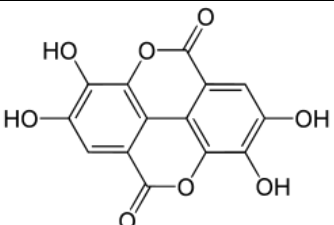
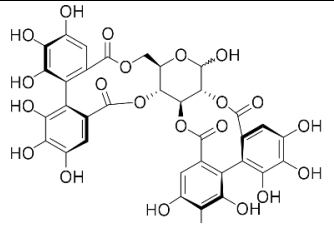
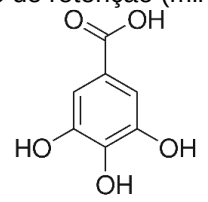
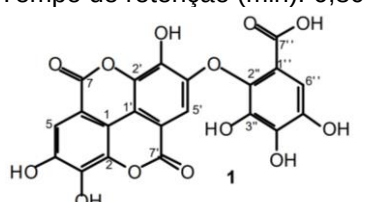


Figura 29 - Os componentes majoritários sugeridos na constituição do extrato etanólico das vagens da (*Libidibia ferrea*), seu percentual na amostra, fórmula molecular, massa molar e tempo de retenção em minutos. A fórmula molecular do galotanino é representada pela fórmula do Ácido gálico multiplicado pela quantidade de molécula desse ácido que forma a cadeia do galotanino.

<i>Libidibia ferrea</i>	
 Ácido elágico Fórmula molecular: $C_{14}H_6O_8$ Massa Molar: 302,197 g/mol Tempo de retenção (min): 7,68	 Galotanino Fórmula molecular: $X.(C_7H_6O_5)$ Massa Molar: $X.170,12$ g/mol Tempo de retenção (min): 6,80
 Ácido gálico Fórmula molecular: $C_7H_6O_5$ Massa Molar: 170,12 g/mol Tempo de retenção (min): 6,05	 Dilactona ácido valoneico Fórmula molecular: $C_{21}H_{10}O_{13}$ Massa Molar: 470,3 g/mol Tempo de retenção (min): 4,28

Fonte: O autor.

6.3. Ensaio de Segurança

6.3.1. Toxicidade oral aguda

No decorrer dos 14 dias experimentais, não foram evidenciadas alterações nos pêlos, pele, olhos e mucosas, sinais de tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia, sono, coma, dor e sofrimento. Por conseguinte, os experimentos foram repetidos a fim de confirmação do resultado anterior, com 3 animais por grupo, ratificando o resultado anterior.

Ainda no percurso do experimento foi avaliado o peso dos animais em experimentação. Logo, foi acompanhado a evolução destes no decorrer dos 14 dias experimentais e eles não apresentaram perda significativa de peso entre a média dos grupos por dia e nem individualmente. Pelo contrário, eles apresentaram evolução crescente no peso, linearmente quando comparado ao grupo controle, e sem apresentação de sinais de tristeza, redução na alimentação. Esses dados estão apresentados na Tabela 5 e 6.

Ficou determinado que a toxicidade oral aguda do o óleo do resíduo de *Carapa guianensis* e o extrato etanólico das vagens da *Libidibia ferrea* é maior que 2000 mg/kg pc e classificado como categoria 5, segundo os critérios do protocolo experimental adotado.

Tabela 4 - Teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.

Teste 1				
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg	<i>C. reticulata</i> 2000mg/Kg	<i>L. ferrea</i> 2000mg/Kg
0	169,83 $\pm$ 27,23 n=3	229,20 $\pm$ 10,20 n=3	227,33 $\pm$ 26,27 n=3	245,00 $\pm$ 25,00 n=3
7	188,60 $\pm$ 25,45 n=3	247,85 $\pm$ 15,85 n=3	233,33 $\pm$ 25,42 n=3	264,00 $\pm$ 30,00 n=3
14	195,07 $\pm$ 22,05 n=3	254,40 $\pm$ 17,40 n=3	237,00 $\pm$ 26,05 n=3	273,00 $\pm$ 32,00 n=3

Tabela 5 - Repetição do teste para confirmação da dose máxima de segurança biológica oral. Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.

Teste 2				
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg	<i>C. reticulata</i> 2000mg/Kg	<i>L. ferrea</i> 2000mg/Kg
0	160,15 $\pm$ 12,68 n=3	188,73 $\pm$ 5,66 n=3	207,67 $\pm$ 20,26 n=3	260,00 $\pm$ 27,00 n=3
7	169,83 $\pm$ 11,19 n=3	196,75 $\pm$ 14,51 n=3	211,33 $\pm$ 20,43 n=3	286,50 $\pm$ 21,50 n=3
14	179,03 $\pm$ 11,32 n=3	200,51 $\pm$ 14,50 n=3	214,67 $\pm$ 20,65 n=3	290,00 $\pm$ 15,00 n=3

6.3.2. Toxicidade dérmica aguda

As alterações no peso dos animais individuais foram avaliadas e comparadas com os animais de controle. Assim, não foram evidenciadas perdas de pesos por animais e nem por peso médio entre os grupos, dados este que podem ser conferidos no teste inicial (Tabela 7) e na repetição do experimento conforme orientação do protocolo OECD 402 (2017) (Tabela 8).

Quanto as observações comportamentais, como salivação, tremores, convulsões, diarreia, letargia, sono e coma, não foram evidenciadas em nenhum dos 12 animais estudados. Foram avaliadas durante os 14 dias as possíveis alterações físicas, como lesões, dores e sinais de doença, bem como as alterações na pele, olhos e mucosas e também frequência respiratória, circulatória, autonômica, sistema nervoso central e comportamento padrões. Consequente, nenhum dos fatores relacionados foram visualizados.

No 14º dia os animais foram avaliados quanto aos critérios de Draize (**Tabela 1**), no qual todos foram avaliados com nota “zero” (0), pois não ocorreu formação de edema e nem eritema no decorrer de todos esses dias de observação. Após essa mensuração, os animais foram eutanasiados e realizados a necropsia completa, como orifícios, olhos, mucosa, pelos e órgão genitores, nada de inconformidade foi encontrado. Partiu-se para a análise de órgãos como pulmões, pâncreas, rins, coração, fígado, estômago, intestino grosso, intestino delgado e a pele que foi tratada. Destes, também não foram encontradas alterações no tamanho, cor e aspectos macroscópicos.

Tabela 6 - Peso dos animais submetidos ao teste de Toxicidade Dérmica Aguda, conforme orienta o protocolo da OECD 402 (2017). Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2.000 mg/Kg.

Teste 1				
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg	<i>C. reticulata</i> 2000mg/Kg	<i>L. ferrea</i> 2000mg/Kg
0	183,00 n=1	173,00 n=1	186,00 n=1	180,00 n=1
7	189,00 n=1	185,00 n=1	191,00 n=1	190,00 n=1
14	198,00 n=1	193,00 n=1	207,00 n=1	203,00 n=1

Tabela 7 - Peso dos animais submetidos à repetição do teste de Toxicidade Dérmica Aguda para confirmação, conforme orienta o protocolo da OECD 402 (2017). Média do peso corporal (Gramas $\pm$ Desvio Padrão) de ratos Wistar expostos oralmente ao veículo controle de diluição da droga (Salina 0,9% e Tween 80 1%) e os produtos naturais na dose de 2000 mg/Kg.

Teste 2				
Dia	Controle	<i>C. guianensis</i> 2000mg/Kg	<i>C. reticulata</i> 2000mg/Kg	<i>L. ferrea</i> 2000mg/Kg
0	192,00 $\pm$ 4,00 n=2	182,00 $\pm$ 4,00 n=2	199,50 $\pm$ 6,00 n=2	197,15 $\pm$ 7,62 n=2
7	199,00 $\pm$ 4,89 n=2	189,50 $\pm$ 2,67 n=2	201,00 $\pm$ 7,56 n=2	209,75 $\pm$ 8,78 n=2
14	206,50 $\pm$ 4,89 n=2	201,00 $\pm$ 3,56 n=2	214,00 $\pm$ 4,89 n=2	218,75 $\pm$ 7,00 n=2

6.3.3. Toxicidade dérmica em doses repetidas

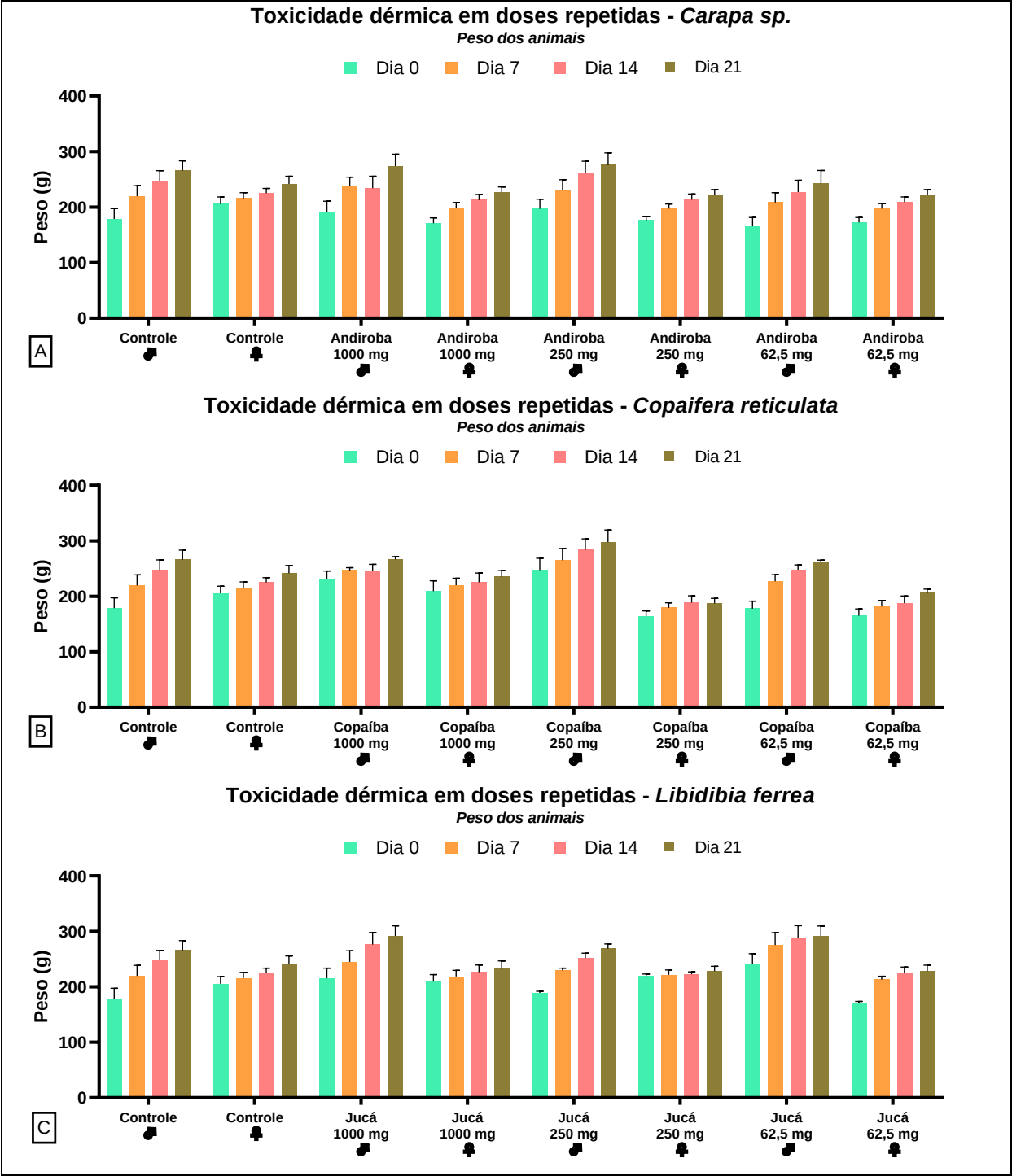
Dentre os parâmetros avaliados para o teste de toxicidade dérmica em doses repetidas, têm-se: peso dos animais, avaliação da necropsia e peso dos órgãos, comportamentos dos animais, parâmetros bioquímicos e hematológicos, e consumo de ração.

6.3.3.1. Peso dos animais:

De acordo com o protocolo utilizado para os experimentos com os ratos Wistar, foi então avaliado a evolução do peso dos animais no decorrer dos 21 dias em que os

roedores receberam a administração por via tópica, na região dorsal do animal. Assim, nesse período de avaliação como demonstrado na Figura 30, observa-se que em todos os grupos com os indivíduos avaliados houve um aumento gradativo do peso nos animais no percurso das 3 semanas de estudo. Esse aumento foi visualizado tanto nos grupos controles, quanto nos experimentais, tanto nos animais do sexo masculino quanto no feminino.

Figura 30 - Peso dos ratos submetidos ao tratamento no decorrer de 21 dias.



6.3.3.2. Necrópsia e Peso de órgãos

Diante das observações no exame necrópsico, não foram evidenciadas sinais que caracterizassem alterações significativas que viessem a confirmar reações toxicológicas quando comparadas ao grupo controle.

Após a necrópsia, foram coletados os órgãos dos animais, a pele tratada e normal. Os rins, fígado e testículos foram pesados imediatamente assim que retirados dos animais e correlacionado ao percentual correspondente ao peso do animal vivo. Essa pesagem foi realizada quase que instantaneamente a dessecção para evitar a secagem dos órgãos.

Assim, nos três órgãos que o protocolo solicita a pesagem, nenhum apresentou alterações referente ao peso relativo com o mesmo órgão do grupo controle (em negrito) diante das análises estatísticas que foram aplicadas (Tabela 9).

Tabela 8 - Peso dos órgãos dos animais submetidos ao estudo da Toxicidade Dérmica em Doses Repetidas, conforme OECD 410 (1981). Os valores do Peso Relativo são expressos em percentual referente ao Peso médio dos animais no dia da eutanásia (% $\pm$ DP). A análise estatística realizada foi o de Anova two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$).

	RINS PESO RELATIVO (%) $\pm$ DP (n=5)	FÍGADO PESO RELATIVO (%) $\pm$ DP (n=5)	TESTÍCULO PESO RELATIVO (%) $\pm$ DP (n=5)	PESO (g) PESO DOS ANIMAIS (g) $\pm$ DP (n=5)
Controle - Feminino	0,716 $\pm$ 0,037	3,461 $\pm$ 0,293	-	246,20 $\pm$ 15,21
Andiroba 1000 mg (F)	0,700 $\pm$ 0,045	3,670 $\pm$ 0,389	-	230,40 $\pm$ 9,37
Andiroba 250 mg (F)	0,769 $\pm$ 0,080	3,531 $\pm$ 0,507	-	225,00 $\pm$ 8,86
Andiroba 62,5 mg (F)	0,786 $\pm$ 0,115	3,527 $\pm$ 0,474	-	224,60 $\pm$ 9,86
Copaíba 1000 mg (F)	0,823 $\pm$ 0,074	4,106 $\pm$ 0,132	-	242,60 $\pm$ 10,26
Copaíba 250 mg (F)	0,802 $\pm$ 0,035	3,933 $\pm$ 0,080	-	193,00 $\pm$ 12,90
Copaíba 62,5 mg (F)	0,729 $\pm$ 0,074	3,772 $\pm$ 0,132	-	208,20 $\pm$ 8,56
Jucá 1000 mg (F)	0,737 $\pm$ 0,038	3,432 $\pm$ 0,345	-	234,40 $\pm$ 13,79
Jucá 250 mg (F)	0,804 $\pm$ 0,039	3,620 $\pm$ 0,271	-	229,20 $\pm$ 8,58
Jucá 62,5 mg (F)	0,732 $\pm$ 0,121	3,564 $\pm$ 0,065	-	230,80 $\pm$ 9,65
Controle - Masculino	0,947 $\pm$ 0,060	4,197 $\pm$ 0,362	1,347 $\pm$ 0,055	268,00 $\pm$ 26,29
Andiroba 1000 mg (M)	0,860 $\pm$ 0,040	3,812 $\pm$ 0,124	1,219 $\pm$ 0,090	137,25 $\pm$ 18,99
Andiroba 250 mg (M)	0,837 $\pm$ 0,021	3,820 $\pm$ 0,340	1,143 $\pm$ 0,021	165,80 $\pm$ 12,11
Andiroba 62,5 mg (M)	0,779 $\pm$ 0,017	4,170 $\pm$ 0,280	1,282 $\pm$ 0,138	146,60 $\pm$ 15,05
Copaíba 1000 mg (M)	0,835 $\pm$ 0,046	4,204 $\pm$ 0,222	1,256 $\pm$ 0,011	277,67 $\pm$ 5,13
Copaíba 250 mg (M)	0,851 $\pm$ 0,004	4,172 $\pm$ 0,115	1,181 $\pm$ 0,092	268,00 $\pm$ 11,31
Copaíba 62,5 mg (M)	0,853 $\pm$ 0,001	4,004 $\pm$ 0,033	1,265 $\pm$ 0,026	261,33 $\pm$ 3,21
Jucá 1000 mg (M)	0,892 $\pm$ 0,023	4,097 $\pm$ 0,469	1,257 $\pm$ 0,116	294,40 $\pm$ 16,37
Jucá 250 mg (M)	0,883 $\pm$ 0,026	3,930 $\pm$ 0,290	1,202 $\pm$ 0,092	273,60 $\pm$ 11,37
Jucá 62,5 mg (M)	0,811 $\pm$ 0,050	3,910 $\pm$ 0,460	1,164 $\pm$ 0,120	294,40 $\pm$ 19,29

6.3.3.3. Consumo de ração

Diariamente, durante o manejo dos animais, era mensurado a quantidade de ração que o animal consumiu no decorrer de 24 horas. Diante desses dados levantados, foi-se avaliado os dados semanalmente do consumo da ração que foram tabulados na Tabela 10.

Assim, observa-se que todos os animais consumiram ração regularmente, com excessão ao grupo tratado com Andiroba à 1.000 mg/Kg, no qual o animal já relatado reduziu drasticamente o consumo de alimento do 9º dia de experimentação até o dia que veio à obito (17º dia), assim reduzindo a média do grupo até o 14º dia. Após esse episódio, os animais restantes conseguiram equilibrar o peso. Os outros animais do mesmo grupo não manifestaram reações que fossem consideradas alarmante no caráter toxicológico.

Tabela 9 - Evolução do consumo de ração pelos animais submetidos ao teste de Toxicidade Dérmica por doses repetidas no decorrer de 21 dias. Os dados são apresentados em peso (gramas $\pm$ DP). Cada grupo possui um *n* de 5 animais, que foram pesados no dia 1, 7, 14 e 21 do experimento. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$).

	Consumo de ração (g) $\pm$ DP (n=5)			
	Dia 1	Dia 7	Dia 14	Dia 21
Controle - Feminino	13,20 $\pm$ 1,45	12,40 $\pm$ 2,88	16,80 $\pm$ 0,84	19,20 $\pm$ 0,84
Andiroba 1000 mg (F)	14,20 $\pm$ 1,55	16,80 $\pm$ 2,59	18,20 $\pm$ 1,30	19,80 $\pm$ 2,17
Andiroba 250 mg (F)	16,40 $\pm$ 0,89	16,60 $\pm$ 1,30	18,40 $\pm$ 1,68	22,60 $\pm$ 1,14
Andiroba 62,5 mg (F)	14,20 $\pm$ 0,84	16,40 $\pm$ 1,14	16,80 $\pm$ 1,10	25,20 $\pm$ 2,59
Copaíba 1000 mg (F)	15,00 $\pm$ 2,01	17,40 $\pm$ 2,07	18,80 $\pm$ 2,39	20,00 $\pm$ 1,95
Copaíba 250 mg (F)	15,20 $\pm$ 1,48	16,80 $\pm$ 2,39	17,20 $\pm$ 2,17	19,40 $\pm$ 1,95
Copaíba 62,5 mg (F)	16,80 $\pm$ 1,92	16,00 $\pm$ 1,22	18,00 $\pm$ 2,12	18,60 $\pm$ 1,56
Jucá 1000 mg (F)	9,60 $\pm$ 1,67	18,60 $\pm$ 0,55	18,80 $\pm$ 1,30	22,20 $\pm$ 0,84
Jucá 250 mg (F)	11,20 $\pm$ 2,17	18,80 $\pm$ 1,30	20,40 $\pm$ 2,00	20,80 $\pm$ 3,27
Jucá 62,5 mg (F)	14,80 $\pm$ 0,84	16,00 $\pm$ 1,30	19,20 $\pm$ 1,70	23,60 $\pm$ 2,10
Controle - Masculino	14,00 $\pm$ 0,80	24,00 $\pm$ 1,95	24,40 $\pm$ 2,50	24,80 $\pm$ 2,92
Andiroba 1000 mg (M)	22,00 $\pm$ 1,00	22,33 $\pm$ 2,31	25,67 $\pm$ 1,53	27,67 $\pm$ 2,03
Andiroba 250 mg (M)	16,50 $\pm$ 0,71	23,00 $\pm$ 1,41	24,50 $\pm$ 0,71	28,00 $\pm$ 2,83
Andiroba 62,5 mg (M)	18,67 $\pm$ 1,15	24,67 $\pm$ 0,58	27,00 $\pm$ 1,73	29,33 $\pm$ 0,58
Copaíba 1000 mg (M)	28,67 $\pm$ 2,31	26,33 $\pm$ 1,15	18,00 $\pm$ 15,13	29,00 $\pm$ 1,41
Copaíba 250 mg (M)	19,00 $\pm$ 2,65	25,67 $\pm$ 2,08	26,67 $\pm$ 3,06	29,00 $\pm$ 1,73
Copaíba 62,5 mg (M)	16,00 $\pm$ 2,10	18,67 $\pm$ 1,40	23,33 $\pm$ 1,98	26,00 $\pm$ 1,00
Jucá 1000 mg (M)	14,00 $\pm$ 0,90	19,20 $\pm$ 3,63	20,80 $\pm$ 0,45	24,20 $\pm$ 1,95
Jucá 250 mg (M)	20,00 $\pm$ 1,76	23,80 $\pm$ 2,01	27,20 $\pm$ 2,20	30,00 $\pm$ 0,40
Jucá 62,5 mg (M)	16,00 $\pm$ 1,54	19,80 $\pm$ 0,84	22,60 $\pm$ 2,20	24,20 $\pm$ 3,63

6.3.3.4. Comportamento dos animais

No animais tratados com Andiroba, Copaíba e Jucá à 1.000 mg/Kg, de ambos os sexos, foram registrados o aumento da agitação, inquietude, piloereção e alguns casos de diarreia. Já nos animais tratados com 1/4 e 1/8 da dose máxima permitida pelo protocolo, não manifestaram alterações na pele, olhos e mucosas, aparelho respiratório, circulatório, autônomo e sistema nervoso central, sinais de tremores, convulsão, salivação, diarreia, letargia, sono, coma, alteração na atividade locomotora e comportamental.

6.3.3.5. Parâmetros bioquímicos

De todos os animais que passaram pelo procedimento experimental, foram coletados o sangue, e do soro foram mensurados os parâmetros bioquímicos em analisador automático BM-200 (Mindray Company). Conforme os dados apresentados na Tabela 11, os animais não apresentaram alterações bioquímicas significativas estatisticamente que fossem caracterizados sinais toxicológicos quando comparados aos grupos controles masculino e feminino.

Tabela 10 - Parâmetros bioquímicos dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410, com *n* de 5 animais cada grupo. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ DP). A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$). Albumina (Alb), Cálcio (Ca^{2+}), Creatinina (Cre), Fósforo (Fos), Glicose (Gli), Proteínas totais (Ptn), Transaminase oxalacética (TGO), Transaminase pirúvica (TGP), Uréia (Ure).

	Alb g/dL	Ca^{2+} mg/dL	Cl^- mEq/L	Cre mg/dL	Fos mg/dL	Gli mg/dL	Ptn g/dL	TGO U/L	TGP U/L	Ure mg/dL
Controle - Feminino	2,33 $\pm 0,81$	5,68 $\pm 1,91$	96,2 $\pm 6,02$	0,3 $\pm 0,13$	31,05 $\pm 3,91$	213,81 $\pm 43,33$	5,94 $\pm 1,90$	313,6 $\pm 12,56$	85,6 $\pm 15,49$	34,68 $\pm 5,03$
Andiroba 1000 mg (F)	3,25 $\pm 0,23$	10,68 $\pm 0,15$	106,5 $\pm 1,29$	0,40 $\pm 0,04$	10,00 $\pm 1,19$	222,25 $\pm 5,25$	6,91 $\pm 0,11$	212,75 $\pm 57,22$	67,75 $\pm 5,91$	56,90 $\pm 8,41$
Andiroba 250 mg (F)	3,68 $\pm 0,26$	10,18 $\pm 0,51$	103,78 $\pm 2,79$	0,27 $\pm 0,07$	32,73 $\pm 4,47$	137,84 $\pm 11,16$	7,43 $\pm 0,34$	324,00 $\pm 26,19$	75,50 $\pm 8,66$	56,28 $\pm 4,98$
Andiroba 62,5 mg (F)	3,23 $\pm 0,17$	11,12 $\pm 0,61$	107,38 $\pm 1,94$	0,39 $\pm 0,05$	11,06 $\pm 0,62$	225,1 $\pm 38,21$	6,59 $\pm 0,49$	250,40 $\pm 47,55$	63,60 $\pm 9,34$	48,26 $\pm 6,30$
Copaíba 1000 mg (F)	3,04 $\pm 0,15$	9,84 $\pm 0,76$	95,3 $\pm 0,74$	0,43 $\pm 0,07$	10,98 $\pm 1,39$	160,4 $\pm 21,22$	6,13 $\pm 0,29$	192,20 $\pm 17,20$	76,8 $\pm 7,6$	47,58 $\pm 7,02$
Copaíba 250 mg (F)	2,82 $\pm 0,67$	9,65 $\pm 0,24$	99,95 $\pm 2,03$	0,26 $\pm 0,15$	7,48 $\pm 1,36$	165,9 $\pm 15,19$	5,99 $\pm 1,39$	214,20 $\pm 36,40$	85,80 $\pm 4,76$	52,75 $\pm 2,96$
Copaíba 62,5 mg (F)	3,32 $\pm 0,32$	9,30 $\pm 0,87$	99,13 $\pm 8,85$	0,35 $\pm 0,13$	10,5 $\pm 2,76$	208,55 $\pm 36,49$	7,06 $\pm 0,84$	166,25 $\pm 18,39$	82,33 $\pm 12,47$	50,70 $\pm 2,14$
Jucá 1000 mg (F)	3,41 $\pm 0,57$	8,08 $\pm 1,2$	99,88 $\pm 11,85$	0,26 $\pm 0,15$	34,8 $\pm 1,61$	220,25 $\pm 64,27$	7,95 $\pm 0,47$	377,25 $\pm 67,27$	95,50 $\pm 11,85$	40,13 $\pm 6,21$
Jucá 250 mg (F)	2,86 $\pm 1,23$	8,43 $\pm 0,45$	95,73 $\pm 6,58$	0,34 $\pm 0,07$	28,86 $\pm 10,99$	196,25 $\pm 28,59$	6,48 $\pm 2,35$	332,60 $\pm 86,44$	95,20 $\pm 21,76$	46,62 $\pm 8,18$
Jucá 62,5 mg (F)	3,15 $\pm 0,45$	9,18 $\pm 1,48$	93,18 $\pm 12,91$	0,21 $\pm 0,11$	9,10 $\pm 0,94$	155,62 $\pm 19,3$	6,29 $\pm 0,99$	230,93 $\pm 11,07$	84,40 $\pm 12,14$	42,00 $\pm 2,66$
Controle - Masculino	2,53 $\pm 0,18$	8,00 $\pm 0,67$	105,42 $\pm 1,16$	0,24 $\pm 0,02$	10,30 $\pm 0,67$	237,82 $\pm 17,83$	5,35 $\pm 0,29$	136,40 $\pm 4,39$	75,2 $\pm 8,29$	38,90 $\pm 2,68$
Andiroba 1000 mg (M)	3,97 $\pm 0,34$	9,50 $\pm 0,81$	106,80 $\pm 9,08$	0,26 $\pm 0,02$	15,3 $\pm 1,3$	88,30 $\pm 7,51$	7,08 $\pm 0,6$	559,00 $\pm 47,52$	189,00 $\pm 16,07$	49,60 $\pm 4,22$
Andiroba 250 mg (M)	3,24 $\pm 0,11$	10,8 $\pm 0,75$	104,33 $\pm 3,06$	0,59 $\pm 0,15$	16,93 $\pm 3,55$	228 $\pm 54,62$	5,93 $\pm 0,34$	262,67 $\pm 25,58$	76,67 $\pm 9,5$	43,67 $\pm 3,67$
Andiroba 62,5 mg (M)	3,18 $\pm 0,06$	13,67 $\pm 5,05$	103,67 $\pm 2,31$	0,18 $\pm 0,05$	12,50 $\pm 2,79$	146,83 $\pm 12,27$	5,89 $\pm 0,39$	327,67 $\pm 70,87$	78,33 $\pm 3,06$	42,50 $\pm 6,36$
Copaíba 1000 mg (M)	3,01 $\pm 0,25$	9,58 $\pm 0,56$	98,33 $\pm 5,16$	0,36 $\pm 0,11$	10,30 $\pm 2,78$	159,25 $\pm 26,41$	6,87 $\pm 1,71$	243,5 $\pm 20,01$	72,25 $\pm 11,24$	48,30 $\pm 9,30$
Copaíba 250 mg (M)	3,11 $\pm 0,07$	10,17 ± 1	101,07 $\pm 4,37$	0,28 $\pm 0,09$	10,63 $\pm 4,04$	179,23 $\pm 13,81$	6,59 $\pm 0,21$	222,67 $\pm 48,69$	90,33 $\pm 2,52$	55,57 $\pm 4,6$
Copaíba 62,5 mg (M)	3,34 $\pm 0,40$	10,23 $\pm 0,12$	106,00 $\pm 3,61$	0,22 $\pm 0,06$	13,37 $\pm 1,48$	160,00 $\pm 55,11$	5,94 $\pm 0,50$	221,33 $\pm 8,5$	77,67 $\pm 10,07$	38,03 $\pm 1,19$
Jucá 1000 mg (M)	2,93 $\pm 0,07$	9,77 $\pm 0,59$	109,49 $\pm 2,76$	0,28 $\pm 0,03$	11,27 $\pm 2,2$	212,5 $\pm 28,11$	6,21 $\pm 0,22$	190,67 $\pm 10,02$	78,67 $\pm 5,86$	35,27 $\pm 6,79$
Jucá 250 mg (M)	3,05 $\pm 0,11$	9,28 $\pm 0,26$	96,24 $\pm 1,08$	0,24 $\pm 0,04$	9,66 $\pm 0,74$	138,72 $\pm 15,51$	6,47 $\pm 0,2$	200,60 $\pm 25,66$	77,20 $\pm 15,69$	42,44 $\pm 7,08$
Jucá 62,5 mg (M)	2,75 $\pm 0,20$	9,20 $\pm 0,16$	95,26 $\pm 2,86$	0,21 $\pm 0,07$	8,24 $\pm 0,9$	153,32 $\pm 26,01$	6,61 $\pm 0,2$	244,60 $\pm 16,32$	93,6 $\pm 14,89$	46,00 $\pm 3,53$

6.3.3.6. Parâmetros hematológicos

Na avaliação das hemácias, hemoglobina, hematócrito e plaquetas, os resultados não mostraram diferenças significativas quando comparados os grupos controles com os grupos tratados com as drogas naturais (Tabela 12).

Na avaliação das células de linhagem branca (Leucócitos), os animais do sexo feminino tratados com andiroba de 1.000 mg/Kg e 250 mg/Kg apresentaram diferença significativa na quantidade de leucócitos. Em relação aos linfócitos, somente no grupo tratado com andiroba a 1000 mg/Kg houve aumento considerável quando comparado com o grupo controle feminino. Quanto aos animais do sexo masculino, estes apresentaram alterações somente no número de leucócitos dos animais tratados com Copaíba 1.000 mg/Kg (Tabela 13).

Tabela 11 - Parâmetros hematológicos da série vermelha dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ Desvio Padrão). Cada grupo possui um *n* de 5 animais. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Turkey ($p < 0,05$).

	Hemácias $\times 10^6/\text{mm}^3$	Hemoglobina g/dL	Hematócrito %	Plaquetas $10^3 / \text{mm}^3$
Controle (F)	7,22 $\pm$ 1,00	14,05 $\pm$ 0,77	38,55 $\pm$ 5,57	440,00 $\pm$ 16,31
Andiroba 1000 mg (F)	7,27 $\pm$ 0,57	14,16 $\pm$ 0,67	45,76 $\pm$ 1,71	588,20 $\pm$ 150,94
Andiroba 250 mg (F)	7,01 $\pm$ 0,34	13,66 $\pm$ 0,75	45,28 $\pm$ 3,19	586,40 $\pm$ 40,86
Andiroba 62,5 mg (F)	6,30 $\pm$ 0,45	13,76 $\pm$ 0,89	43,22 $\pm$ 3,40	559,00 $\pm$ 86,70
Copaíba 1000 mg (F)	6,83 $\pm$ 0,60	13,52 $\pm$ 1,15	37,72 $\pm$ 2,87	620,20 $\pm$ 111,88
Copaíba 250 mg (F)	5,29 $\pm$ 0,97	14,04 $\pm$ 0,89	34,78 $\pm$ 4,59	616,00 $\pm$ 63,35
Copaíba 62,5 mg (F)	6,02 $\pm$ 0,57	12,56 $\pm$ 0,74	34,08 $\pm$ 3,15	357,50 $\pm$ 80,45
Jucá 1000 mg (F)	7,49 $\pm$ 0,59	13,98 $\pm$ 1,67	39,43 $\pm$ 2,84	472,50 $\pm$ 124,78
Jucá 250 mg (F)	7,15 $\pm$ 0,85	13,48 $\pm$ 1,68	38,06 $\pm$ 4,54	302,40 $\pm$ 50,32
Jucá 62,5 mg (F)	5,92 $\pm$ 1,26	12,42 $\pm$ 2,42	32,76 $\pm$ 7,25	347,20 $\pm$ 44,17
Controle (M)	7,47 $\pm$ 0,11	13,90 $\pm$ 0,28	39,30 $\pm$ 0,14	740,50 $\pm$ 173,24
Andiroba 1000 mg (M)	7,89 $\pm$ 0,67	15,45 $\pm$ 1,48	45,20 $\pm$ 3,84	783,00 $\pm$ 16,97
Andiroba 250 mg (M)	6,89 $\pm$ 1,64	13,80 $\pm$ 2,86	39,95 $\pm$ 10,54	631,67 $\pm$ 47,26
Andiroba 62,5 mg (M)	9,88 $\pm$ 3,32	15,20 $\pm$ 0,66	46,95 $\pm$ 1,91	657,33 $\pm$ 189,50
Copaíba 1000 mg (M)	6,27 $\pm$ 1,04	13,70 $\pm$ 1,27	39,58 $\pm$ 7,18	1076,75 $\pm$ 215,93
Copaíba 250 mg (M)	6,00 $\pm$ 2,35	14,70 $\pm$ 1,11	40,33 $\pm$ 12,98	752,00 $\pm$ 88,90
Copaíba 62,5 mg (M)	7,99 $\pm$ 0,68	16,37 $\pm$ 0,59	16,73 $\pm$ 28,98	428,33 $\pm$ 66,50
Jucá 1000 mg (M)	6,94 $\pm$ 1,03	13,52 $\pm$ 1,66	39,00 $\pm$ 4,65	730,80 $\pm$ 43,76
Jucá 250 mg (M)	7,21 $\pm$ 1,32	14,24 $\pm$ 2,49	39,36 $\pm$ 6,42	705,00 $\pm$ 150,76
Jucá 62,5 mg (M)	7,16 $\pm$ 1,36	14,60 $\pm$ 2,30	35,25 $\pm$ 7,28	441,75 $\pm$ 96,88

Tabela 12 - Parâmetros leucocitários dos animais submetidos ao protocolo da OECD 410. Os dados são apresentados conforme a unidade internacional de cada analito (Média $\pm$ Desvio Padrão). Cada grupo possui um *n* de 5 animais. A análise estatística realizada foi o de ANOVA two way seguido do Teste de Múltipla comparação de Tukey ($p < 0,05$). Leucócitos (Leuc), Granulócitos (Gran), Linfócitos (Linf), Monócitos (Mon).

	Leuc /mm ³	Gran /mm ³	Linf /mm ³	Mon /mm ³	Gran %	Linf %	Mon %
Controle (F)	6150,00 $\pm$ 369,68	1748,10 $\pm$ 129,4	4165,35 $\pm$ 54,94	536,55 $\pm$ 286,59	27,15 $\pm$ 2,90	64,60 $\pm$ 1,27	8,25 $\pm$ 4,17
Andiroba 1000 mg (F)	8270,00 $\pm$ 479,06 ****	2133,66 $\pm$ 181,36	5573,98 $\pm$ 473,79 ****	562,36 $\pm$ 47,80	25,80 $\pm$ 2,19	67,40 $\pm$ 5,73	6,8 $\pm$ 0,58
Andiroba 250 mg (F)	6990,00 $\pm$ 1022,00 *	1625,18 $\pm$ 215,13	4707,77 $\pm$ 144,33	671,04 $\pm$ 265,79	23,25 $\pm$ 1,63	67,35 $\pm$ 4,03	9,60 $\pm$ 2,69
Andiroba 62,5 mg (F)	6702,00 $\pm$ 1689,24	1761,29 $\pm$ 629,86	4460,18 $\pm$ 1142,02	481,20 $\pm$ 183,78	26,28 $\pm$ 1,56	66,55 $\pm$ 1,84	7,18 $\pm$ 1,07
Copaíba 1000 mg (F)	6420,00 $\pm$ 1441,18	1617,84 $\pm$ 467,21	4237,20 $\pm$ 801,45	564,96 $\pm$ 191,48	25,20 $\pm$ 1,92	66,00 $\pm$ 2,35	8,80 $\pm$ 1,3
Copaíba 250 mg (F)	6658,00 $\pm$ 971,4	1660,51 $\pm$ 460,21	4135,95 $\pm$ 523,01	861,55 $\pm$ 287,27	24,94 $\pm$ 4,12	62,12 $\pm$ 6,28	12,94 $\pm$ 2,94
Copaíba 62,5 mg (F)	6724,00 $\pm$ 850,98	1780,52 $\pm$ 637,95	4224,02 $\pm$ 711,68	719,47 $\pm$ 164,51	26,48 $\pm$ 5,21	62,82 $\pm$ 4,73	10,70 $\pm$ 5,05
Jucá 1000 mg (F)	6450,00 $\pm$ 1771,06	1946,5 $\pm$ 338,98	4370,33 $\pm$ 1271,07	616,50 $\pm$ 355,10	28,80 $\pm$ 4,9	62,67 $\pm$ 2,12	8,53 $\pm$ 3,09
Jucá 250 mg (F)	6050 $\pm$ 1159,74	1680,3 $\pm$ 855,74	4511,1 $\pm$ 558,76	508,60 $\pm$ 141,14	24,25 $\pm$ 7,14	68,2 $\pm$ 7,5	7,55 $\pm$ 0,35
Jucá 62,5 mg (F)	6566 $\pm$ 400,97	1728,2 $\pm$ 38,46	4492,26 $\pm$ 378,65	494,55 $\pm$ 62,86	25,80 $\pm$ 2,12	66,85 $\pm$ 1,63	7,35 $\pm$ 0,49
Controle (M)	7250,00 $\pm$ 919,24	2057,15 $\pm$ 118,44	4657,85 $\pm$ 529,55	535,00 $\pm$ 271,25	28,50 $\pm$ 1,98	64,30 $\pm$ 0,85	7,20 $\pm$ 2,83
Andiroba 1000 mg (M)	7300,00 $\pm$ 525,3	1949,10 $\pm$ 202,55	4832,60 $\pm$ 502,21	518,30 $\pm$ 53,86	26,70 $\pm$ 2,27	66,20 $\pm$ 5,63	7,10 $\pm$ 0,60
Andiroba 250 mg (M)	7040,00 $\pm$ 404,15	1804,36 $\pm$ 218,96	4688,64 $\pm$ 104,2	547,00 $\pm$ 80,99	25,63 $\pm$ 1,42	66,6 $\pm$ 2,03	7,77 $\pm$ 0,61
Andiroba 62,5 mg (M)	6990,00 $\pm$ 600,69	1782,45 $\pm$ 103,63	4767,18 $\pm$ 443,73	440,37 $\pm$ 61,07	25,50 $\pm$ 0,60	68,20 $\pm$ 0,53	6,30 $\pm$ 0,40
Copaíba 1000 mg (M)	7740,50 $\pm$ 407,68 ****	2266,40 $\pm$ 264,75	4596,30 $\pm$ 863,49	878,55 $\pm$ 356,18	29,28 $\pm$ 4,81	59,38 $\pm$ 4,82	11,35 $\pm$ 3,29
Copaíba 250 mg (M)	7370,33 $\pm$ 669,05	1905,20 $\pm$ 818,96	4676,50 $\pm$ 2043,57	788,63 $\pm$ 326,58	25,85 $\pm$ 13,36	63,45 $\pm$ 18,74	10,70 $\pm$ 5,37
Copaíba 62,5 mg (M)	7200,00 $\pm$ 563,47	1826,60 $\pm$ 73,27	4368,20 $\pm$ 446,22	1005,80 $\pm$ 82,43	25,37 $\pm$ 1,65	60,67 $\pm$ 1,53	13,97 $\pm$ 0,35
Jucá 1000 mg (M)	7450,00 $\pm$ 645,92	2145,60 $\pm$ 285,30	4669,70 $\pm$ 291,66	635,49 $\pm$ 181,51	28,80 $\pm$ 4,90	62,67 $\pm$ 2,12	8,53 $\pm$ 3,09
Jucá 250 mg (M)	7342,00 $\pm$ 653,31	2232,00 $\pm$ 408,35	4563,10 $\pm$ 375,86	546,98 $\pm$ 57,24	30,40 $\pm$ 1,98	62,15 $\pm$ 1,91	7,45 $\pm$ 0,07
Jucá 62,5 mg (M)	7350,00 $\pm$ 685,57	2344,70 $\pm$ 192,33	4557,80 $\pm$ 401,99	547,58 $\pm$ 42,07	31,90 $\pm$ 0,14	60,65 $\pm$ 0,21	7,45 $\pm$ 0,29

6.3.4. Ensaio de irritação/corrosão ocular aguda in vitro (HET-CAM)

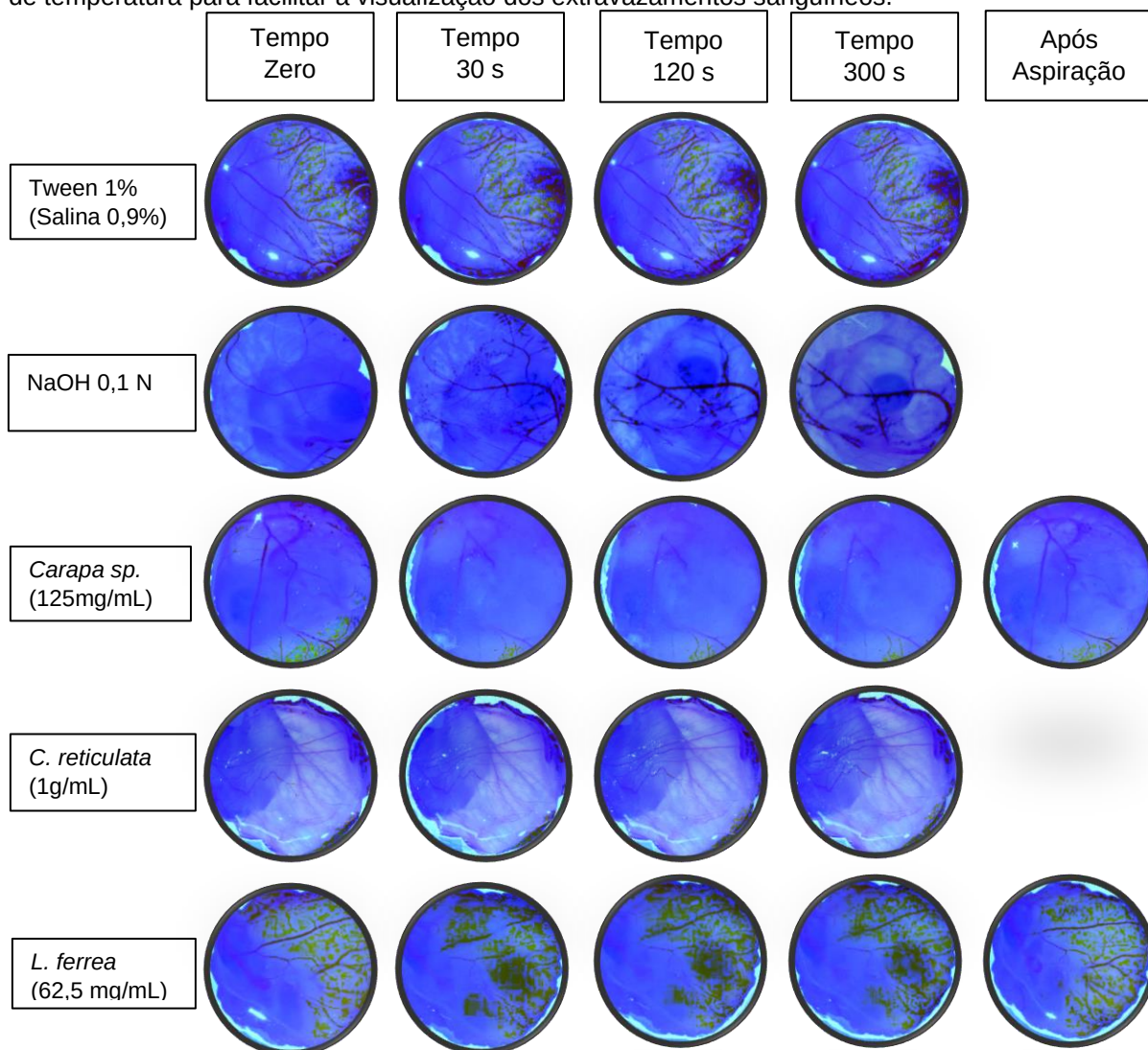
No ensaio de irritação ocular as doses de estudos de escolha foram de 1.000 mg/kg para o óleo-resina de *C. reticulata*, 125 mg/mL para o extrato etanólico de *Carapa sp.* e 62,5 mg/mL para a *Libidibia ferrea*. Os dois últimos produtos naturais tiveram suas amostras diluídas por causa da opacidade que afetava a visualização das veias dos ovos, assim dificultando a observação da formação do extravasamento dos vasos e fazendo com que fosse necessário a aspiração das drogas após os 5 minutos para facilitar a visualização conforme estabelece o protocolo.

Nenhuma das espécies avaliadas apresentaram sinais de lise, hemorragia e coagulação, classificando-as como “não rotulado” ou como substâncias não irritantes”. Já o controle positivo apresentou uma pontuação de 17,60 ($\pm 0,75$) que confirma a atividade tóxica do NaOH 0,1N e o classifica como produto indutor de “Irritação grave”, conforme tabela 14 e Figura 31. O controle negativo adotado foi a solução salina à 0,9% com Tween 1% e não foram evidenciados sinais de toxicidade e classificado como “Não rotulado”.

Tabela 13 - Pontuação de irritação e classificação do produto conforme ao índice de irritação no teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane - HET-CAM). **** Diferença estatística apresentada quando comparada com o grupo controle Tween 1% ($p \leq 0,0001$; $n=5$). Os resultados foram expressos em Média ($\pm$ E.P.M.). ANOVA One-way, Teste de Múltipla Comparação de Tukey.

Substância	Índice de Irritação (Score)	Classificação
Tween 1% (Salina 0,9%)	0,0 ($\pm 0,0$)	Não rotulado
NaOH 0,1 N	17,60 ($\pm 0,75$) ****	Irritação grave
<i>Carapa sp</i> (125mg/mL)	0,0 ($\pm 0,0$)	Não rotulado
<i>C. reticulata</i> (1g/mL)	0,0 ($\pm 0,0$)	Não rotulado
<i>L. ferrea</i> (62,5 mg/mL)	0,0 ($\pm 0,0$)	Não rotulado

Figura 31 – Resultados do teste de HET-CAM em ovos embrionados. As Fotografias tiveram ajustes de temperatura para facilitar a visualização dos extravazamentos sanguíneos.



6.3.5. Citotoxicidade

6.3.5.1. Citotoxicidade por Red blood cell (RBC)

De acordo com os resultados alcançados no teste de citotoxicidade pelo método de RBC (Red blood cell), o óleo-resina de *C. reticulata* e os extratos etanólicos da *L. ferrea* e da *Carapa* sp. não demonstraram citotoxicidade nos diferentes grupos avaliados, apresentando uma baixa porcentagem de hemólise quando comparados ao grupo controle positivo tratado com o detergente Extran (100 %). Foram realizados testes nas concentrações de 2.000, 1.000, 500, 250, 125, 62,5, 31,25 e 15,625 µg/mL das três espécies.

O extrato etanólico obtido do resíduo da prensagem das amêndoas de andiroba (*Carapa sp.*), na maior concentração avaliada (2.000 µg/mL) a porcentagem de hemólise apresentou uma média de 16,46% ($\pm 1,09\%$) e foi reduzindo até 0,34% ($\pm 0,11\%$) na última concentração testada que foi de 15,625 µg/mL, quando comparado ao grupo tratado com o detergente extran, controle positivo (100% de hemólise), conforme Figura 32.

O outro extrato etanólico que é objetivo dos estudos, extrato das vagens do jucá, também não produziu efeito hemolítico que caracterizasse uma ação citotóxica. O efeito na maior concentração produziu 10,06% ($\pm 1,27\%$) de hemólise quando comparado ao grupo controle positivo. Na menor concentração, o resultado da ação hemolítica também foi menor, 0,53% ($\pm 0,20\%$), conforme apresentado na Figura 33.

Já na avaliação da atividade hemolítica do óleorresina de *C. reticulata*, o percentual de hemólise registrado na maior concentração (2.000 µg/mL) foi de 4,40% ($\pm 0,63\%$) e, conforme fosse reduzindo as concentrações, linearmente também diminuía o percentual de hemólise até $0,96 \pm 0,67$ (15,625 µg/mL), conforme Figura 34.

Figura 32 - Resultados do Teste *in vitro* de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da *Carapa sp.* sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise $\pm$ Desvio Padrão).

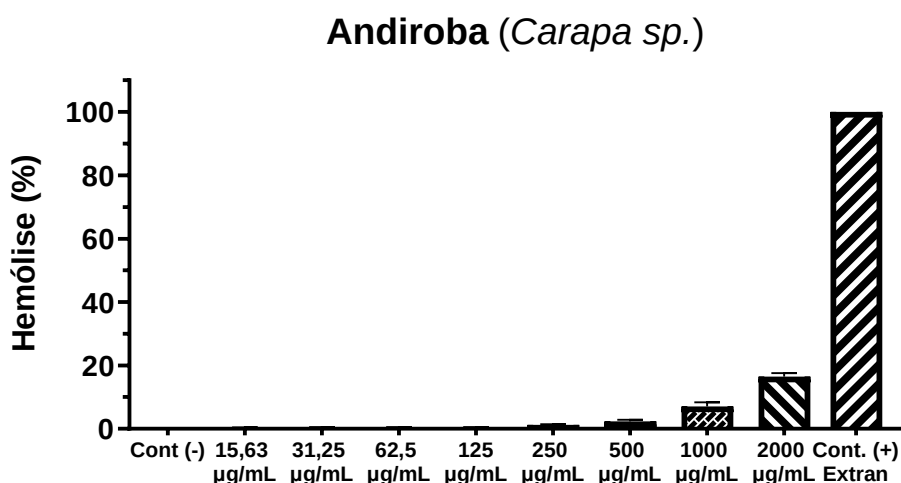


Figura 33 - Resultados do Teste *in vitro* de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da *Copaíba reticulata* sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise $\pm$ Desvio Padrão).

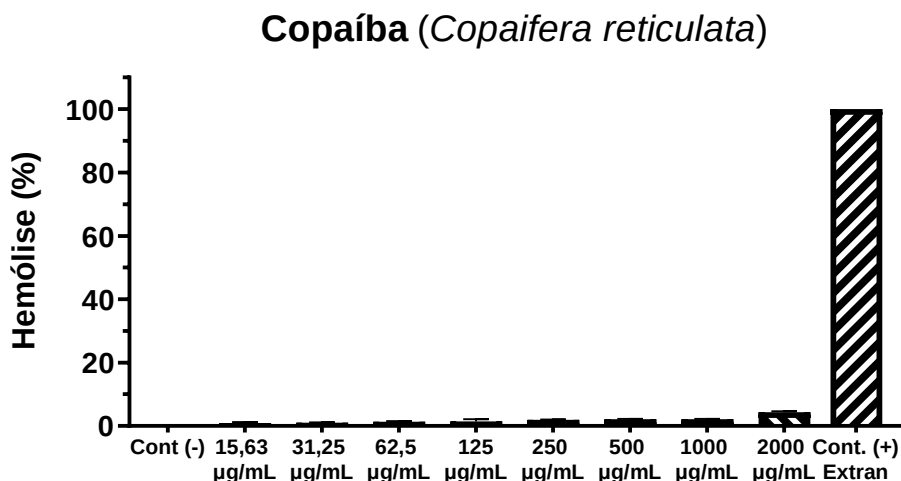
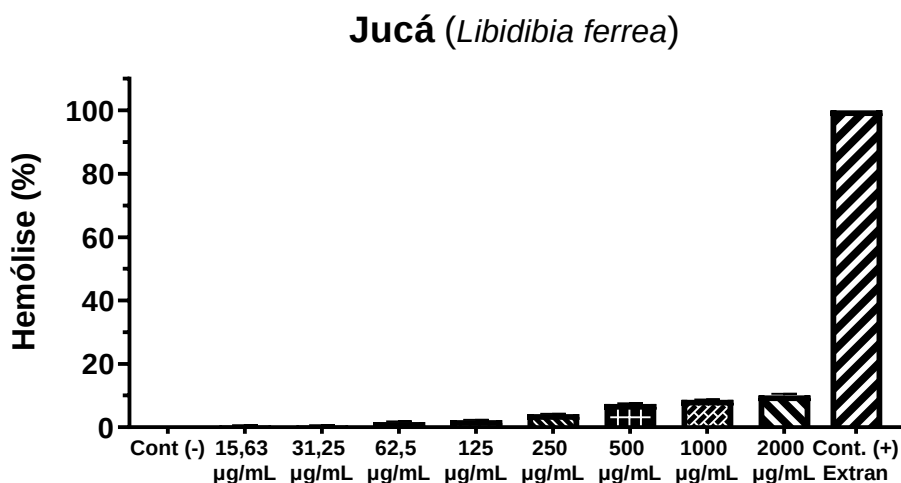


Figura 34 - Resultados do Teste *in vitro* de RBC – Red blood cell para avaliação da atividade citotóxica da *Libidibia ferrea* sobre a ação hemolítica na membrana das hemácias de mamíferos. Os resultados foram expressos em Média (Percentual de hemólise $\pm$ Desvio Padrão).



6.4. Ensaio de Eficácia - Atividade antimicrobiana

As três espécies estudadas de forma isoladas e em associação apresentaram atividade antimicrobianas evidentes frente a alguns patógenos, mas com perfis de sensibilidade diferenciado. Os resultados da Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) são apresentados na Tabela 15.

A CIM apresentada no experimento do óleo-resina de copaíba demonstrou o efeito antimicrobiano frente ao *Staphylococcus aureus* (31,25 mg/ml), *S. epidermidis* (125 mg/ml) e *S. pyogenes* (0,03 mg/ml). No estudo do extrato etanólico do resíduo

da andiroba, a CIM obtida demonstrou efeito antibacteriano na *Staphylococcus epidermidis* (7,81 mg/ml) e *Streptococcus pyogenes* (3,91 mg/ml) e para a *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* a concentração inibitória mínima ficou acima da dose inicial avaliada. O extrato etanólico do jucá também promoveu efeito biológico na *Pseudomonas aeruginosa* (1,95 mg/ml), *S. aureus* (0,49 mg/ml), *Staphylococcus epidermidis* (0,12 mg/ml), *Streptococcus pyogenes* (1,95 mg/ml). No grupo controle de esterilidade e no grupo controle positivo não houve crescimento bacteriano.

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) também foi avaliada nos experimentos. O óleorresina de *C. reticulata* apresentou CBM para *Staphylococcus epidermidis* (250 mg/ml) e *S. pyogenes* (0,03 mg/ml) e no *Staphylococcus aureus* a CBM ficou acima da maior concentração avaliada (>250 mg/ml). O extrato do resíduo da andiroba demonstrou a concentração bactericida mínima para *Streptococcus pyogenes* (15,63 mg/ml) e para as outras cepas bacterianas estudadas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) o CBM estabelecido foi acima da maior dose estudada. O extrato da *L. ferrea* produziu efeito CBM com as cepas bacterianas avaliadas, *Pseudomonas aeruginosa* (15,63 mg/mL), *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis* (7,81 mg/mL) e *Streptococcus pyogenes* (3,91 mg/mL). O CIM e CBM para *Escherichia coli* foram determinados acima das concentrações iniciais de tratamento para as três espécies estudadas.

Quando associado os três produtos naturais em apenas uma formulação, denominada Copanju, e avaliado seu efeito antimicrobiano contra as cepas testadas e com maior predominância de infecções dérmicas, observou-se efeito farmacológico contra todas as bactérias, com exceção da *E. Coli* que não apresentou efeito nem com as drogas usadas de forma isolada.

Tabela 14 - Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração Bactericida mínima (CBM) do óleo-resina de *C. reticulata* e do extrato etanólico do resíduo da prensagem das amêndoas de *Carapa sp.* e das vagens da *Libidibia ferrea*. Copanju (óleo-resina de *C. reticulata* e do extrato etanólico do resíduo da prensagem das amêndoas de *Carapa sp.* e das vagens da *Libidibia ferrea*).

	OCR <i>C. reticulata</i> mg mL ⁻¹		Ext.EtOh <i>Carapa sp.</i> mg mL ⁻¹		Ext.EtOh <i>Libidibia ferrea</i> mg mL ⁻¹		Copanju mg mL ⁻¹		Ampicili na mg mL ⁻¹
	CIM	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM	MIC
<i>P. aeruginosa</i> (CCCD P003)	> 250 mg/mL	> 250 mg/mL	> 125 mg/ml	> 125 mg/ml	1,95 mg/ml	15,63 mg/ml	1,56 mg/ml	6,25 mg/ml	> 256 ug/mL
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	31,25 mg/ml	> 250 mg/ml	> 125 mg/ml	> 125 mg/ml	0,49 mg/ml	7,81 mg/ml	0,39 mg/ml	6,25 mg/ml	16 ug/ml
<i>S. epidermidis</i> ATCC 12228	125 mg/ml	250 mg/ml	7,81 mg/ml	> 250 mg/ml	0,12 mg/ml	7,81 mg/ml	0,20 mg/ml	25 mg/mL	32 ug/ml
<i>S. pyogenes</i> ATCC 19615	0,03 mg/ml	0,03 mg/ml	3,91 mg/ml	15,63 mg/ml	1,95 mg/ml	3,91 mg/ml	25,0 mg/ml	25,0 mg/ml	8 ug/ml
<i>E. coli</i> ATCC 25922	> 250	> 250	> 125	> 125	> 125	> 125	> 50 mg/ml	> 50 mg/ml	4 ug/ml

6.5. Obtenção da formulação semissólida a base de manteiga de *Astrocaryum murumuru* Mart. contendo óleo-resina de *Copaifera reticulata* e os extratos etanólicos de *Carapa sp.* e *Libidibia ferrea*.

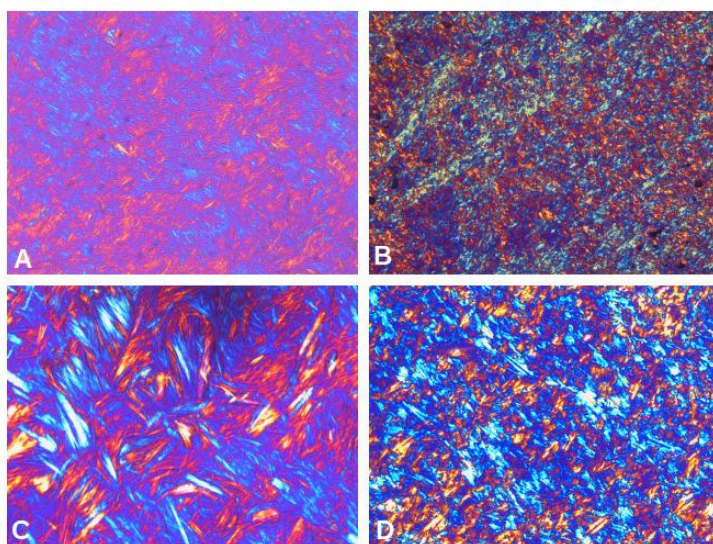
Ao preparar a formulação óleo-resina de *Copaifera reticulata* e os extratos etanólicos de *Carapa sp.* e *Libidibia ferrea* que foram incorporados ao agente tensoativo e manteiga de murumuru, observou-se um produto fitoterápico de cor esverdeada e com característica homogênea (Figura 35). Após 24 horas de preparação da formulação, foi colocado uma pequena amostra do produto sob uma lâmina de vidro e cuidadosamente foi coberta com uma lamínula para distribuir o conteúdo pela aplicação de pressão e examinada sob luz polarizada a 25 °C. Conforme apresentado na Figura 36, a formulação mostrou birrefringência com texturas raiadas que é característico de uma fase hexagonal que é demonstrado pela presença de estrias quando o plano de luz polarizada incide sobre a amostra. Na figura 36A e 36C, é apresentado a formulação sem a incorporação dos produtos vegetais.

Figura 35 - Formulação preparada com aspecto homogêneo e de cor esverdeada.



Fonte: O autor

Figura 36 – Fotomicrografias em microscopia de Luz Polarizada (PLM) da formulação semissólida com Copaíba, andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru. (A) Fotomicrografia da formulação semissólida somente com manteiga de murumuru em objetiva de 10x. (B) Fotomicrografia da formulação semissólida com Copaíba, andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru em objetiva de 10x. (C) Fotomicrografia da formulação semissólida somente com manteiga de murumuru em objetiva de 20x. (D) Fotomicrografia da formulação semissólida com Copaíba, andiroba e jucá à 2,5% em manteiga de murumuru em objetiva de 20x.



Fonte: O autor

7. Discussão

As plantas são muito utilizadas para cura, tratamento e profilaxia de diversas enfermidades desde os primórdios da história humana, muitas vezes sem restrições e de forma indiscriminada. Logo, é de fundamental importância o estabelecimento da segurança, eficácia e o conhecimento da constituição química das plantas medicinais, pois seu uso de forma indiscriminada, sem o conhecimento toxicológico necessário, pode originar efeitos adversos (SACHETTI et al., 2009).

Existem diversos vegetais amazônicos que são muito reconhecidos popularmente pelos seus respectivos potenciais terapêuticos. Dentre esses produtos, pode-se citar o óleo de andiroba, o óleorresina de copaíba e o extrato de jucá. Estes produtos são descritos nas literaturas como antiinflamatório, cicatrizante e antimicrobiano. Diante disso resolvemos trabalhar com uma associação destes três produtos a fim de desenvolver uma inovação terapêutica com espectro amplo de eficácia (AMÉRICO et al., 2020; N. M. GOMES et al., 2007; GUILHON-SIMPLICIO et al., 2015; NOVELLO et al., 2015; SANTIAGO et al., 2015; A. S. SOARES et al., 2021; VALDIR & PINTO, 2002).

Para um fitoterápico ser desenvolvido, este tem que cumprir com várias normas, dentre elas a RDC N° 26, de 13 de maio de 2014, qual solicita que para registro do produto tem que apresentar relatório de Segurança e Eficácia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014). Nessa mesma resolução, é solicitado que o proponente apresente os marcadores biológicos de cada espécie proposta.

Então, optou-se pelo uso do extrato etanólico dos resíduos das amêndoas de andiroba adquiridos de empresas produtoras de óleo que, anualmente, centenas de toneladas desse resíduo são produzidas e apenas 1% desse lixo são reaproveitados para produção de velas. Com esse alto volume de resíduo produzido, torna-se necessário buscas de alternativas biosustentáveis para a reutilização desse produto (SENA DE SAN-MARTIN & BARATA, 2019). Uma solução sustentável para esses produtos é a extração etanólica dos resíduos da andiroba para a retirada de mais metabólitos secundários. Então, realizou-se uma extração alcoólica em soxhlet para obtenção do extrato que foi 26% de rendimento, resultado muito próximo ao alcançado por Sena De San-Martin & Barata (2019), que obtiveram 24%.

Para Sena De San-Martin & Barata (2019) e Reis et al. (2021), o percentual de rendimento é considerado alto quando levado em consideração a extração com uso

de outras partes anatômicas da planta. Isso ocorre devido a presença do óleo vegetal e ainda retido no resíduo após o processo de prensagem industrial e, com a ajuda do solvente orgânico etanol e aumento da temperatura, facilitou a extração de substâncias polares e apolares como ácidos graxos e compostos de média polaridade como os limonóides (SENA DE SAN-MARTIN & BARATA, 2019).

Desse extrato etanólico do resíduo da andiroba, foi realizado a caracterização químico por cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas (GC-MS) e também por cromatografia líquida de alta resolução acoplada ao espectrômetro de massas (UPLC-MS), para conhecer os marcadores biológicos da espécie conforme solicita a RDC N° 26, de 13 de maio de 2014 (Ministério Da Saúde, 2014). Como resultados, observamos a presença do ácido gálico, ácido gentisínico, Andiolide S, Andiolide B, ácido copálico, 6,7-dihidroflavopereirina e o Geissolaevina no UPLC-MS e dos ácidos graxos ácido linoleico, ácido palmítico, ácido oleico, ácido láurico, ácido mirístico, ácido esteárico, ácido caprílico e ácido cáprico no GC-MS. Esses resultados corroboram com o de Tanaka et al., (2011) e o de Sakamoto et al. (2013) que relatam a presença dos limonóides Andiolide B e S. Já a presença de ácidos graxos corrobora com os estudos apresentados por Melo et al. (2018), Milhomem-Paixão et al. (2017), que citam como principais metabolitos secundários os ácidos oléico, palmítico e linoleico.

Segundo Reis et al. (2021), os constituintes químicos das amêndoas de andiroba ficam retidos nas paredes celulares e para serem extraídos, torna-se necessário a utilização de solventes e aumento de temperatura a fim de otimizar o processo, reduzindo o tempo de extração e aumentando a eficiência. Nas referenciais teóricos relatam que os principais ácidos graxos presentes nos triglicerídeos do óleo das sementes de andiroba são os ácidos oleico, palmítico, esteárico e linoleico (ARAÚJO et al., 2017; IHA et al., 2014; NOVELLO et al., 2015). Para Dias et al., (2023), a andiroba é rica em ácidos graxos, triterpenos, esteroides, alcaloides, cumarinas, flavonoides e limonóides. Diante desses aspectos, os resultados apresentados em GC-MS e UPLC-MS corroboram com o descrito na literatura.

O segundo ativo a ser utilizado na formulação é o óleorresina de *C. reticulata*. Esse produto é muito difundido na comunidade amazônica e nas áreas tropicais devido ao seu potencial terapêutico. Assim, foi realizado a hidrodestilação do e obteve a separação da fração do óleo essencial (sesquiterpenos) da resinosa (diterpenos).

Assim, no óleo-resina ficou determinado que 61% era sesquiterpenos e 39% diterpenos. Em seguida foi realizada a caracterização química em GC/MS e obteve como constituintes majoritários os sesquiterpenos β -cariofileno, β -bisaboleno, α -humuleno e os diterpenos ácido cauranoico e ácido caurenóico. Outros estudos também relataram a presença desses constituintes, no entanto, em concentrações variadas conforme fatores sazonais e regiões (ALMEIDA JÚNIOR ET AL., 2021). D. G. Santos et al., (2020b) estudaram quimicamente o óleo-resina da *Copaifera reticulata* da cidade de Mojú no estado do Pará e identificou também o β -bisaboleno, β -cariofileno e α -humuleno. Entretanto, esse último apareceu no produto em concentrações bem menores, 1,3%. Lima, T. C. P. et al. (2020), realizaram a caracterização química do óleo-resina de *Copaifera reticulata*, da cidade de Belterra (Pará, Brasil), em cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massa (GC-MS) e determinaram a presença majoritária de β -Cariofileno (39,91%), β -Bisaboleno (7,38%), α -Humuleno (3,15%), predominando nesta amostra os compostos voláteis em relação aos compostos resinosos.

Outro trabalho que corrobora com este estudo é o de Kobayashi et al. (2011), avaliaram por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, o óleo-resina de *Copaifera multijuga*, coletado em uma reserva localizada no estado do Amazonas, e foram observados a presença dos sesquiterpenos β -cariofileno (36,03%), β -bisaboleno (8,54%) e α -Humuleno (3,79%). No trabalho desenvolvido por Izumi et al (2013) investigaram a composição química de *C. reticulata* e observaram a presença dos compostos majoritários os sesquiterpenos β -cariofileno (40,90%) e, como diterpenos, foi observado a presença do ácido caurenóico (3,90%). Este trabalho vem corroborar com a composição química apresentada pela copiaba em nossos estudos (IZUMI et al., 2013).

O terceiro ativo da formulação é o extrato etanólico das vagens do jucá. Essa planta é muito difundida popularmente devido aos inúmeros potenciais terapêuticos. Sendo assim, realizou-se a extração em solvente alcoólico e obteve o rendimento de 23,5% de extrato bruto. Desse produto, foi realizado a caracterização química em cromatografia líquida de alta eficiência e comparado os espectros com as literaturas. Logo, pode-se sugerir a presença dos constituintes ácido gálico, ácido elágico e galotanino. Segundo Jacques & Zambiasi (2011), o elágico é um composto fenólico derivado da molécula do ácido gálico. Já o galotanino corresponde a uma molécula

de D-glucose ligadas pelas hidroxilas com 6 até 9 moléculas de ácido gálico (BATTESTIN; KATSUMI MATSUDA; ALVES MACEDO, 2004).

Alguns autores relatam que os principais metabólitos secundários encontrados *L. ferrea* são os ácidos fenólicos, ácido gálico e ácido elágico (AMÉRICO et al., 2020; KOBAYASHI et al., 2015; MACÊDO et al., 2020; POURNAGHI et al., 2020). M. R. A. Ferreira et al. (2016) coletaram 14 amostras dos frutos de jucá de diferentes regiões do Brasil e realizou a análise química por cromatografia de camada delgada e também cromatografia líquida de alta performance (HPLC). Diante disso, observou que em todos os materiais vegetais analisados havia a presença do ácido gálico e também do ácido elágico.

É fundamental, porém, o estabelecimento da segurança, eficácia e garantia da qualidade destas preparações, pois seu uso inadequado, sem o conhecimento toxicológico necessário, pode originar efeitos adversos retardados e/ou assintomáticos (SACHETTI et al., 2009). O objetivo de ensaios toxicológicos pré-clínicos em plantas medicinais é avaliar a capacidade de indução da toxicidade, antecipar os riscos envolvidos nas drogas, garantindo a seguridade do uso no homem e conhecendo seus possíveis efeitos tóxicos. Os estudos pré-clínicos de segurança são realizados *in vivo* e *in vitro*. Os métodos *in vitro* têm boa aceitabilidade e as comunidades internacionais reguladoras de produtos farmacêuticos dão muito enfoque em favor da racionalização do uso de animais em pesquisas de novos fármacos e cosméticos, como no caso dos 3R's. No entanto, alguns testes *in vivo* são imprescindíveis a fase de estudos pré-clínica pois fornecem informações mais precisas sobre a segurança e eficácia dos novos fármacos (BEDNARCZUK et al., 2010; BOELSTERLI, 2003; SILVA et al., 2021b; SOBRINHO et al., 2017).

Um caso relevante é o Teste de Toxicidade Oral Aguda, qual é preconizado pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development-OECD) sob o protocolo OECD 423 (OECD 423, 2002) e também está descrito no Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da Anvisa (Anvisa, 2013). Segundo Sachetti et al. (2009), o este guia foi publicado com a finalidade de substituir o de número 401 da mesma instituição, que foi banido definitivamente pela OECD em 2001 por conta do extenso número de

animais que eram utilizados nos experimentos, que tinham um *n* de 20 animais por grupo e vários grupos com doses crescentes.

Este método apresenta boa reprodutibilidade, usa poucos animais e é capaz de classificar as substâncias de acordo com sistemas internacionalmente aceitos (Globally Harmonised System - GHS) e se baseia na avaliação biométrica com doses fixas pré-estabelecidas para a classificação e riscos no qual o indivíduo será submetido ao receber a substância em estudo) (SACHETTI et al., 2009).

Então, foi adotado este método para estudo do óleorresina de *Copaifera reticulata* e dos extratos etanólico do resíduo da andiroba e das vagens do jucá na dose de 2.000 mg/Kg via oral. Segundo o protocolo OCDE-423/2001, quando já existem trabalhos científicos com mesmo gênero da espécie de planta a ser estudada que nos dão informação de que a mortalidade é improvável no mais alto nível da dose inicial, pode-se utilizar a maior dose (OECD 423, 2002). Como resultados alcançados no experimento nenhum animal apresentou morte, perda de peso e sinais comportamentais que fossem caracterizados como toxicidade, tanto no grupo controle quanto nos tratados com as drogas vegetais. Assim, estes produtos foram classificados como Categoria 5 que quer dizer produto de alta segurança biológica.

Esses dados referentes a Andiroba corroboram com os estudos de Miranda Júnior et al., (2012), que determinou a toxicidade oral aguda do óleo de andiroba *in natura* com doses acima de 2,0 g/Kg. Outro trabalho que também atesta este resultado é o de Costa-Silva et al. (2008), que tratou os animais com doses até 5,0 g/kg e não observou nenhum sinal de toxicidade ou morte em ratos durante 14 dias de experimento, podendo a DL50 ser superior que a dose testada.

Nossos estudos com copaíba corroboram com os apresentados por Almeida Júnior et al. (2021), e Sachetti et al., (2009), que pesquisaram o óleorresina de *C. reticulata* pela via oral e relataram que a DL50 está acima da dose testada que foi de 2.000 mg/Kg. Já Gomes et al. (2007) foi mais a fundo e determinou o valor da DL50 em 3,9 g/Kg. M. A. C. Silva et al. (2022) estudaram a toxicidade oral aguda da *Copaifera* spp adquirido de uma indústria na dose de 2.000 mg/Kg. Os animais estudados não foram evidenciados morte ou estado moribundo, embora fosse uma redução significativa na força de preensão dos ratos, provavelmente devido a problemas de capacidade neuromuscular induzidos por óleorresina de copaíba em uma dosagem mais alta. No entanto, o comportamento geral ou a função fisiológica

dos animais expostos à óleoresina de copaíba não foi afetado. Peso corporal, ingesta de ração e hidratação não indicaram efeito adverso relacionado ao tratamento. Os ratos expostos à óleoresina de copaíba mostraram uma diminuição significativa no peso relativo do fígado em comparação com o grupo controle.

Os resultados apresentados Kobayashi et al. (2015), quando avaliaram os animais tratados com 5.000 mg/Kg do extrato de *Libidibia ferrea* em dose única oral, fortalece nossos resultados pois o jucá demonstrou boa segurança para ensaios farmacológicos e apresentou baixo potencial tóxico, onde não apresentou sinais clínicos de toxicidade, como alterações comportamentais e físicas ou mortalidade. Outro estudo que contribui com nossos achados é o de Souza et al. (2006), que determinou o DL50 do jucá em 2.200 mg/kg.

Como o propósito deste trabalho é o desenvolvimento de uma formulação de uso tópico, este trabalho também realizou a investigação da Toxicidade Dérmica Aguda em ratos, conforme requer o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos (ANVISA, 2013). Esta é uma metodologia baseada nas diretrizes da OECD 402 (2017), qual regulamenta a metodologia de Toxicidade Dérmica aguda em ratos. Esse teste utilizou ratas fêmeas devido sua maior sensibilidade e avalia a toxicidade dérmica através de uma análise biométrica para classificação de perigo de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS).

Como resultados alcançados, não foram evidenciados sinais que pudessemos classificar as três substâncias utilizadas como tóxicas ou irritantes a pele dos animais tratados, nem sinais de vermelhidão, morte ou alguma resposta sistêmica que fosse observada pelas avaliações biométricas. Logo, classificou-se os produtos testados como seguros na mais alta dose testada (2.000 mg/Kg).

Como não foi demonstrado toxicidade em uso tópico de forma aguda, os experimentos continuaram com o teste subagudo, com 21 dias de aplicações diárias dos três produtos de forma isolada sendo que de cada espécie era constituído por 3 grupos. Os protocolos de toxicidade subaguda são instrumentos de experimentação que permitem a identificação de órgãos e células afetadas pela administração de determinado agente bem como os mecanismos de toxicidade envolvidos. Foi adotado o protocolo da OECD número 410, que é utilizado como teste padrão pela ANVISA para registro de novos medicamentos de uso dérmico. Dentre os parâmetros

avaliados, têm-se: peso dos animais, avaliação da necropsia e peso dos órgãos, comportamentos dos animais, parâmetros bioquímicos e hematológicos, e consumo de ração (ANVISA, 2012; OECD, 1981).

O primeiro grupo foi constituído com a dose máxima permitida pelo protocolo da OECD de número 410, que é de 1.000 mg/Kg e que tenha a expectativa de produzir efeitos tóxicos observáveis, mas não à morte e nem sofrimento. O segundo e terceiro grupo foram constituídos por 1/4 e 1/8 da maior dose do experimento como solicita o protocolo e que corresponde a 250 e 62,50 mg/Kg. Essa menor dose não deve produzir qualquer evidência de toxicidade e a dose intermediária deve produzir efeitos toxicológico mínimo observável. Os ratos *Wistar* foram selecionados por simular a ação das drogas testes no corpo humano, considerando a farmacocinética, farmacodinâmica, biodisponibilidade e biotransformação das drogas estudadas. Assim, foi considerada a mesma via de administração em que a droga será administrada em humanos (tópica) (ANVISA, 2012; OECD, 1981).

Os estudos de toxicidade de doses repetidas têm como objetivo, caracterizar o perfil toxicológico da substância pela administração repetida. A partir deles é possível a obtenção de informações sobre os efeitos tóxicos, identificação de órgãos alvos, efeitos na fisiologia do animal, hematológicas, bioquímicas, anátomo e histopatológicas, além de informações sobre a indicação do Nível de dose sem observação de efeito (NOEL) e Nível de dose sem observação de efeito adverso (NOAEL) (Anvisa, 2012; OECD, 1981). A alteração nos parâmetros hematopoiéticos e/ou bioquímicos do corpo serve como alvo de compostos tóxicos e pode, portanto, ser indicativa de toxicidade antes de estudos clínicos em seres humanos (MAHAMA et al., 2022).

A avaliação da massa corporal dos animais e o consumo de ração são parâmetros a serem observados para caracterização de toxicidade. Animais que demonstram perda de peso e redução na alimentação no decorrer de experimentos desse tipo, demonstram sinais de desconforto e se caracteriza como sinais de toxicidade (REBOREDO et al., 2007). Diante desses aspectos, os animais tratados com controle, óleoresina de copaíba, extrato etanólico do resíduo da andiroba e das vagens do jucá, apresentaram evolução crescente no peso e não demonstraram redução de consumo de ração com o passar dos dias experimentais em todos os grupos. Na necrópsia e pesagem dos órgãos, não foram observados sinais alterados

e nem variação de massa quando comparados com o grupo controle. Da análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (série vermelha), não foram evidenciadas alterações que fossem significativas quando comparado os resultados com o do grupo controle. No estudo da série leucocitária (células brancas), foram observadas alterações somente nos grupos de Copaíba de 1000 mg/Kg (machos) e Andiroba de 1000 e 250 mg/Kg (fêmea), que apresentaram aumento significativo no número de leucócitos. Entretanto, esses valores estão classificados como dentro do limite de normalidade conforme os estudos de C. M. Lima et al., (2014) e os de F. de A. S. de Oliveira et al., (2021) que caracterizaram os perfis hematológicos e bioquímicos dos animais criados nos Biotérios da Universidade Tiradentes e Universidade Federal da Paraíba, respectivamente.

Costa-Silva et al., (2008) estudaram a toxicidade oral subaguda do óleo das sementes de *Carapa guianensis* nas doses 0,375, 0,75 e 1,5 g/kg por 30 dias consecutivos em *Ratos Wistar* machos e fêmeas adultos. Como resultados alcançado, observaram que não produziu morte ou sinais clínicos de toxicidade, não alterou o peso corporal e a ingestão hídrica durante o período de tratamento, os parâmetros hematológicos permaneceram abaixo da faixa de referência para a espécie. Os parâmetros bioquímicos avaliados (glicose, creatinina, uréia, TGO, TGP, Colesterol total, triglicerídeos, fosfatase alcalina, bilirrubina total e direta, proteína total e albumina) não foram alterados, com exceção do TGP no grupo tratado com a mais alta dose o que sugere uma sobrecarga hepática. Quanto a análise de órgãos, tanto o peso absoluto quanto o relativo do fígado foram aumentados pelo óleo das sementes de *Carapa guianensis*, sugerindo hipertrofia hepática associado ao edema hepático. Para o autor, as doses utilizadas no presente estudo representam até 15 vezes maior do que a dose utilizada como agente terapêutico.

Além de estudar a toxicidade oral aguda, M. A. C. Silva et al. (2022) estudaram também a toxicidade oral subaguda da *Copaífera spp* adquirido de uma indústria nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg pc durante 28 dias. Como dados observados, os animais não apresentaram sinais de mortalidade ou anormalidade, não houve alteração na ingesta de água e não teve alterações no peso corporal, não houve diferenças significativas entre os pesos relativos dos órgãos dos ratos, não houve alterações nos parâmetros hematológicos. Os dados da análise bioquímica mostraram uma diminuição significativa na fosfatase alcalina em três doses de óleoresina de copaíba

e grupos satélites. Houve aumento significativo de proteína total e albumina na dose alta de óleo de copaíba, mas voltou aos valores de controle no grupo satélite. A bilirrubina total aumentou significativamente devido a um aumento na bilirrubina indireta no grupo satélite em comparação com os grupos controle e tratado com óleo de copaíba. As análises histopatológicas do fígado, rins, coração e intestino dos animais expostos à alta dose de óleoresina de copaíba não mostraram diferenças significativas em relação ao grupo controle.

A toxicidade renal é umas das mais comum observadas nos estudos de descoberta de novos produtos. Em caso de identificação de nefrotoxicidade por meio de análises histológicas, torna-se necessário a suspensão precocemente da pesquisa de um fármaco, mesmo quando valores normais de ureia e creatinina são observados. Diante disso, Galvão et al., (2020) avaliaram o potencial de nefrotoxicidade ocasionado pelo uso do Óleo de Copaíba em ratos, na dose de 0,63mL/kg, via gavagem, uma vez ao dia, durante 28 dias e não identificaram a interferência do óleoresina de copaíba na função renal, dentro da metodologia proposta para o presente estudo, e o tempo da administração para cada grupo não exerceu influência nos achados histopatológicos.

Contribuindo com os estudos aqui alcançados, Reboredo et al., (2007) realizaram um estudo com ratos Wistar e os trataram com o jucá (300 mg/Kg) via oral durante 5 dias. Durante o tratamento não ocorreram mortes e não foi detectada a ocorrência de piloereção, alteração da atividade locomotora e nenhum outro sinal clínico de toxicidade. Também não foram evidenciados perda de peso corporal e nem redução no consumo de ração, não teve variação de peso no pulmão, fígado, rim e testículo.

Já nos estudos apresentados por Vasconcelos et al., (2020) foi demonstrado algumas alterações nos animais tratados com extrato da casca do caule de *Libidibia ferrea* nas doses de 300 e 1500 mg/ kg pc/dia por gavagem, no decorrer de 12 semanas. Nos experimentos, nenhum animal chegou a falecer, não houve alterações comportamentais ou sinais de toxicidade nos animais quando comparado ao grupo controle. Entretanto, foi demonstrado uma perda de peso no início e que logo foi restabelecido. Essa redução pode estar relacionada a presença de taninos que estão correlacionados a perda de peso. No consumo de ração e ingesta hídrica foi demonstrada uma redução na parte final do experimento, que interferiu no peso dos

animais. Na necrópsia do coração, rim, pulmão, fígado, estômago, intestino, pâncreas, testículo e epidídimo, que não apresentaram alterações significativas na massa, cor ou textura quando comparados ao grupo controle. Na avaliação do peso absoluto e relativo, na dose de 300 mg/kg pc/dia, foi induzido um aumento na massa relativa do coração, rim, estômago e ainda a diminuição da massa do tecido pulmonar. No tratamento com 1.500 mg/Kg, ocorreu uma diminuição do peso absoluto da vesícula seminal e do ducto deferente e aumento relativo da massa do estômago, intestino delgado e testículo. Na análise histológica, todos os órgãos examinados mostraram aspectos normais, exceto o rim que apresentou leve infiltrado de leucócitos e o intestino, onde observou-se infiltrado de leucócitos intraepitelial e áreas de necrose. Os dados bioquímicos respaldaram os resultados histopatológicos, visto que ocorreu diminuição nas proteínas totais plasmáticas e albumina e que pode ser devido a enteropatias ou perda de proteínas, ocasionada por danos renais. Os animais tratados apresentaram aumento nos valores de aspartato aminotransferase (AST), lactato desidrogenase (LDH) e amilase. Na análise hematológica, a contagem de eritrócitos, hematócrito, hemoglobina, plaquetas não foram alterados. Entretanto, o número de linfócitos aumentou juntamente com o de leucócitos. Já a contagem relativa de neutrófilos teve uma redução significativa quando comparada ao grupo controle.

A investigação da irritação ocular de um produto se torna importante para produtos dermatológicos, visto que a substância preparada poderá atingir acidentalmente os olhos do indivíduo. Até então, a forma usual de avaliar o poder de irritação e corrosão ocular era pelo método estabelecido por Draize et al., (1944) que preconizava o uso dos produtos com aplicação dermatológica deveriam ser testados nos olhos exclusivamente dos coelhos, por conta de sua sensibilidade e apresentar melhores resultados em comparação com outros animais. Logo, como esse teste utiliza animais nos experimentos, para o comitê de ética de uso animal é necessário de adotemos testes *in vitro* estabelecidos e que pesquisem a atividade de irritação/corrosão ocular aguda. Apesar disso, existem estudos que propõem a utilização de métodos alternativos para a determinação da irritabilidade oftálmica, tais como o teste de membrana cório-alantóide do ovo de galinha (Hens Egg Test-Chorion Allantoic Membrane - HET-CAM) que simula a estrutura da córnea humana devido a sensibilidade e a altíssima vascularização e que em contato com substâncias irritantes pode ser observados efeitos agressivos como lise, hemorragia e coagulação (Chorilli

et al., 2009; ICCVAM, 2010).

Para a avaliação do potencial de irritação/corrosão ocular do óleo/resina de copaíba, do extrato etanólico do jucá e do resíduo da andiroba, foi escolhido este método, o qual é capaz de reduzir e refinar o uso de animais nos testes de irritação ocular, reduzir o tempo necessário para avaliar uma substância quando comparado com o método *in vivo* de Draize et al. (1944) e investigar na forma semiquantitativa a capacidade de irritação de produtos em estudo sobre a membrana córneo-alantóide de ovo embrionado de galinha no décimo dia de incubação (CHORILLI et al., 2009; ICCVAM, 2010). Além do mais, este teste é reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária através do Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos (Anvisa, 2012) e é baseado no Guia N° 263 da OECD (OCDE 263, 2017), que realiza abordagens integradas para os testes e avaliações de lesões oculares graves e irritação ocular.

Com observado nos experimentos, não foram observados nos ovos tratados com as drogas experimentais reações como lise, hemorragia e coagulação, que caracterizasse efeitos irritantes. Já os ovos tratados com o NaOH demonstraram o efeito irritante evidente. Logo, não foram encontrados nas literaturas trabalhos envolvendo a investigação da irritação ocular com ativos de andiroba, copaíba e jucá.

O ensaio de RBC é um método recomendado pela Anvisa (2012) e é capaz de avaliar a citotoxicidade de produtos pela indução de hemólise das hemácias em combinação com os danos causados às proteínas celulares liberadas no decorrer do processo toxicológico. Além da viabilidade celular, este teste também é considerado um método avaliativo de irritação ocular, o que vai contribuir com os resultados expostos pelo método Het-cam (NÓBREGA et al., 2012; PAPE; PFANNENBECKER; HOPPE, 1987). Como resultados alcançados no teste de citotoxicidade pelo método de RBC (Red blood cell), o óleo/resina de *C. reticulata* e os extratos etanólicos da *L. ferrea* e da *Carapa sp.* não demonstraram citotoxicidade nos diferentes grupos avaliados, apresentando uma baixa porcentagem de hemólise até mesmo na maior concentração (2.000 µg/mL) quando comparados ao grupo controle positivo tratado com o detergente Extran (100 %).

Na literatura não foram encontrados estudos que correlacionasse o efeito hemolisante do óleo ou extrato de andiroba. No entanto, para o jucá e copaíba foram encontrados trabalhos que corroborasse com este estudo. Izumi et al., (2013)

estudaram a atividade hemolítica da *C. reticulata* e observaram que esta copaíba exibiu 50% de atividade hemolítica em concentrações superiores a 500,0 µg/mL. Em estudo realizado por Miguel (2017) foi investigado a atividade hemolítica da *Copaifera langsdorffii* e observaram que na mais alta concentração testada (2.000 µg/mL), o percentual de hemólise promovido foi de 2,41%. Em estudo de Cavalheiro et al. (2009), o extrato bruto das sementes *L. ferrea* não causou hemólise em nos eritrócitos de rato e coelho embora tenha sido relatada, para essa espécie, a presença de compostos conhecidos por serem responsáveis pela atividade hemolítica, tais como compostos fenólicos e saponinas, que promovem tal efeito pela da oxidação da hemoglobina. Assim, a concentração desses compostos nas sementes não foi suficiente para causar hemólise dos eritrócitos. No trabalho realizado por Assis et al. (2023) o extrato de Jucá apresentou hemólise de 8,68% na concentração de 2000 µg/mL, qual foi considerada de baixa ação hemolítica. Esses achados corroboram a classificação da atividade hemolítica descrita neste estudo.

A Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014, por meio da Seção VI, requer além do Relatório de segurança, solicita também o de eficácia/efetividade. Nesse documento deve dispor de toda efetividade farmacológica ao que o produto proposto a autorização terá como aplicabilidade. Como este trabalho se propõe desenvolver uma inovação terapêutica segura e que possua efeito antimicrobiano, torna-se necessário a comprovação dessa atividade terapêutica (Ministério Da Saúde, 2014).

Infecções de pele e tecidos moles são fenômenos muito comuns em ambientes hospitalares e de atendimento emergencial. Lesões na pele podem acarretar em uma colonização por microrganismos e aumentam o risco de desenvolver infecções que podem levar até a morte. Logo, a atividade antimicrobiana então foi avaliada *in vitro*, pelo método de microdiluição em caldo para determinação do CIM e CBM das cepas de *S. aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes* e *Escherichia coli*, que são usualmente as bactérias patogênicas associadas a infecções em feridas e que podem causar desde simples infecções, com a presença de pus, à infecções necrosantes graves (SITAREK et al., 2020).

Então, observou-se que o extrato etanólico do resíduo das amêndoas de andiroba se mostrou eficaz para *S. epidermidis* e *S. pyogenes*. Assim como neste estudo, Packer & Da Luz (2007) também não observaram atividade microbiana do óleo de andiroba em cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*. Souza B. A. A et al. (2017),

em avaliação da cicatrização em ratos Wistar diabéticos, relataram que o óleo de *C. guianensis* não inibiu o crescimento de microrganismos associados a infecções de feridas, que sua atividade de cicatrização é independente de sua atividade antimicrobiana. Então, a ação antimicrobiana evidenciada neste trabalho contra as cepas de *S. epidermidis* e *S. pyogenes*, pode ser relacionada à presença de limonóides, que são tetranortriterpenóides altamente oxigenados que possuem uma ampla gama de atividades biológicas, como antibacteriano (ROY; SARAF, 2006; TUNDIS; LOIZZO; MENICHINI, 2013). Estudos nos mostram também que o ácido palmítico possui boa ação antimicrobiana, o que sinaliza para a atividade farmacológica do extrato do resíduo poder ser atribuída também aos ácidos graxos (AWANG-JAMIL et al., 2019; DAS, 2018; HUANG et al., 2011).

O OCR apresentou espectro de atividade para *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*. A ação antimicrobiana do óleoresina de copaíba é atribuída ao pool de terpenóides que agem sob a estrutura da parede celular bacteriana, fato este já comprovado em muitos microrganismos, incluindo bactérias gram-negativas e, principalmente, gram-positivas, como *Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp (Tobouti et al. 2017). Ziech et al. (2013) estudaram o efeito antibacteriano do óleoresina da *Copaifera reticulata* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva, *S. aureus* por exemplo, e determinaram a CIM de 164mg/mL e CBM de 1,31mg/mL. No estudo realizado por Santos D. G. et al., (2020b), o efeito antibacteriano do óleoresina de *C. reticulata* foi investigado e observaram que óleoresina e as frações com hidrocarbonetos sesquiterpênicos e ácidos diterpênicos inibiram o crescimento bacteriano da cepa de *S. aureus*, entretanto não demonstrou ação contra a *E. coli*, dados estes que corroboram com estes estudos. Em outro trabalho desenvolvido por Mendonça & Onofre (2009) que estudaram o óleoresina de uma outra espécie de copaíba (*C. multijuga*) com culturas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) e demonstraram que o material vegetal teve sua ação terapêutica estabelecida, sendo que nas concentrações de 1,56% a 100% houve inibição do crescimento dos patógenos avaliados. Na avaliação da atividade antimicrobiana usando *C. langsdorffii* e *C. officinalis*, Pieri et al., (2012) ao testarem a atividade farmacológica contra bactérias patogênicas humanas, conseguiram mostrar eficiência terapêutica dos derivados

vegetais contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, e *Pseudomonas aeruginosa*.

Já o extrato de jucá demonstrou efetividade contra todos os patógenos testados, com exceção da *Escherichia coli*. Essa ação farmacológica acontece devido a presença dos metabólitos secundários presentes extrato vegetal, como taninos (representado pelo ácido gálico e ácido elágico), flavonoides e alcaloides, que são produzidos em função de uma infecção bacteriana neste vegetal e que podem alterar a parede celular ou destruir a membrana plasmática dos patógenos, diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano facilitando a absorção das drogas (AMÉRICO et al., 2020; DE ALENCAR FERREIRA et al., 2016). Silva & Almeida (2014) supõem três prováveis mecanismos de ação da atividade antimicrobiana dos taninos como: a inibição das enzimas bacterianas e/ou complexação dos substratos dessas enzimas; a ação dos taninos sobre as membranas dos microrganismos que acarreta na alteração do metabolismo; e a complexação dos taninos com íons metálico, reduzindo assim a disponibilidade destes elementos essenciais para o metabolismo das bactérias.

No estudo apresentado por Ferreira et al. (2016) foi testado o efeito antibacteriano dos extratos, da vagem e ainda a entrecasca da árvore de jucá contra as cepas bacterianas de *S. aureus* (ATCC 25293), *E. coli* (ATCC 25922) e *P. aeruginosa* (ATCC 9027) e ainda as espécies multirresistentes de *S. aureus* (SA10), *E. coli* (EC06) e *P. aeruginosa* (PA32). Diante dos resultados alcançados, observaram que os extratos etanólicos da casca e das vagens de *L. ferrea* apresentaram valores de CIM de 1024 µg/mL para *Staphylococcus aureus* (ATCC 25293), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), bem como *S. aureus* multirresistente (SA10), *E. coli* (EC06) e *P. aeruginosa* (PA 32). No estudo realizado por Américo et al. (2020), a atividade antimicrobiana *in vitro* do jucá extrato liofilizado do jucá (*Libidibia ferrea*) apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (250 µg/ml), *E. coli* (125 µg/ml), *P. aeruginosa* (15,625 µg/ml). Segundo os autores, tais propriedades farmacológicas estão relacionadas à presença de taninos e flavonoides, que possuem propriedades antimicrobianas devido à inibição de enzimas, modificando o metabolismo nas membranas microbianas e diminuindo a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo microbiano (AMÉRICO et al., 2020).

Quando foi testado a associação do OCR, ExtOH das vagens de jucá e dos resíduos das amêndoas da andiroba, numa concentração inicial de 50 mg/mL de cada produto natural, qual corresponde a um produto à 5% de cada constituinte, este também efeito antimicrobiano frente a todas as cepas testadas, com exceção da *E. coli* que seu possível efeito pode estar na concentração acima da inicial avaliada que foi de 50 mg/ml. Então, é demonstrado a viabilidade do uso dessa formulação que associe esses três produtos naturais no combate a infecções dérmicas.

Após o teste pré-clínico de eficácia antimicrobiano, foi desenvolvida a formulação contento os três produtos objeto desse estudo numa concentração de 2,5%, o equivalente a 25 mg/g de creme de cada material vegetal que foram incorporados à manteiga de murumuru. Essa manteiga é produzida das sementes oleaginosas da palmeira de *Astrocaryum murumuru* Mart. de onde se extrai um óleo fixo que tem capacidade em substituir alguns excipientes farmacêuticos e é rica em ácidos graxos como láurico, mirístico e oleico. A natureza anfifílica da manteiga de “murumuru” fornece um sistema de entrega tópica com a ocorrência de uma fase líquida cristalina que pode ser obtida na presença de quantidades adequadas de água e tensoativos. Esse sistema é biodegradável, biocompatível e de fácil aplicação, permitindo a incorporação de fármacos com diferentes coeficientes de partição em sua matriz (SILVA et al., 2021a).

Essa formulação apresentou uma coloração esverdeada de consistência homogênea e sem separação de fases. Por meio da microscopia de luz polarizada, essa preparação foi avaliada e demonstrou anisotropia e birrefringência com texturas em formas de estrias raiadas, característica da fase hexagonal. Sendo assim, a incorporação do OCR, ExtOH das vagens de jucá e dos resíduos das amêndoas da andiroba não alterou a mesofase líquida cristalina auto-organizada.

Para Gong et al. (2011), em seu trabalho que relata a fotomicrografia sob um plano de luz polarizada, descreve que para uma formulação ser anisotrópica ela tem que ser capaz de desviar o plano da luz incidente e isotrópica se não desviar a luz. Assim, mesofases lamelares e hexagonais são classificadas como anisotrópicas, enquanto que as cúbicas são isotrópicas

Estes sistemas líquidos cristalinos do tipo hexagonal obtidos de lipídios anfifílicos (como observado na composição da manteiga de *A. murumuru*) podem resistir à degradação por fluidos corporais e aumentar o tempo de retenção da

formulação no local de uso da droga, permitindo uma liberação sustentada de ativos e aumentando a eficácia terapêutica (AMÉRICO et al., 2020; SILVA et al., 2021a).

8. Conclusão

O objetivo deste trabalho foi realizar a pesquisa e o desenvolvimento de um produto fitoterápico com segurança e eficácia baseado em plantas medicinais amazônicas e que tivesse ação antimicrobiana.

Os produtos naturais abordados neste estudo foram óleorresina de Copaíba (*Copaifera reticulata*), o extrato etanólico do resíduo industrial de Andiroba (*Carapa sp*) e das vagens de Jucá (*Libidibia ferrea*).

O óleorresina de *C. reticulata* é um produto natural que possui como componentes químicos majoritários os compostos sesquiterpênicos β -cariofileno, β -bisaboleno e α -humuleno. O extrato etanólico do resíduo das amêndoas de *Carapa sp.* é um produto rico em ácidos graxos, como ácido linoleico, ácido palmítico e ácido oleico, e sobretudo os limonóides Andiolide S e Andiolide B. Já o extrato etanólico de *L. ferrea*, pode-se sugerir a presença em seu extrato do ácido elágico e ácido gálico.

Ensaio pré-clínicos de segurança e eficácia foram realizados para verificar a toxicidade individual de cada um dos extratos que entraram na formulação do fitoterápico. Ao realizar os ensaios pré-clínicos de segurança dos três produtos naturais objeto deste estudo, observou-se que ambos apresentaram toxicidade oral e dérmica aguda superior a 2.000 mg/Kg, assim classificando como droga de alto nível de segurança biológica. No teste de toxicidade dérmica em doses repetidas, os animais tratados com os três produtos não apresentaram redução de peso e nem do consumo de ração. Eles ainda não apresentaram alterações significativas em todos os parâmetros avaliados, com exceção dos animais do sexo feminino tratados com 1.000 mg/Kg do resíduo da andiroba produziram aumento na contagem global de leucócitos decorrente do aumento significativo do número de linfócitos e também nos animais do sexo masculino tratados na mesma dose com copaíba que apresentaram aumento considerável no número de leucócitos. No teste de irritação ocular e atividade citotóxica não foram observadas alterações significativas.

No estudo pré-clínico de eficácia, através da atividade antimicrobiana, a incorporação do óleorresina de *Copaifera reticulata* com os extratos etanólicos do resíduo da *Carapa sp.* e das vagens do *Libidibia ferrea* produziu excelente ação farmacológica contra *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. pyogenes*.

Com o ensaios pré-clínicos de segurança, os resultados dos ensaios indicaram relativa segurança para a formulação de um produto fitoterápico. A formulação desses produtos com a incorporação da manteiga de murumuru atribuiu ao produto estabilidade, durabilidade e eficiência farmacológica.

Em suma, este trabalho evidenciou a segurança e eficácia antimicrobiana do óleoresina de *Copaifera reticulata* e dos extratos etanólico do resíduo da *Carapa sp.* e das vagens do *Libidibia ferrea*. Este estudo contribui para a fundamentação do uso destes produtos medicina popular, embora sejam necessários novos estudos mais aprofundados para caracterizar o mecanismo de ação farmacológica desses produtos.

9. Referências Bibliográficas

ABRAHAM, A.; CHAN, E.; PARK, H. Fast understanding of phases and phase separation in liquid crystal drug delivery systems using deuterium solid-state NMR. **Solid State Nuclear Magnetic Resonance**, v. 106, 2020.

AHMAD, A. et al. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against Candida. **Microbial Pathogenesis**, v. 48, n. 1, 2010.

ALENCAR, J. DA C. Estudos silviculturais de uma população natural de Copaifera multijuga Hayne-Leguminosae, na Amazônia Central. 1-Germinação(*). **Acta Amazônica**, v. 11, n. 1, p. 3–11, 1981.

ALMEIDA, N. C. O. DA S.; FURTADO, S. DA C.; BARCELLOS, J. F. M. A Narrative Review of Libidibia ferrea: Botanical Aspects, Ethnopharmacological Properties, Phytochemical Characteristics, Toxicity, and Experimental Tests. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 32, n. 12, p. 16–30, 2021.

ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n. 3, p. 450–513, 3 jul. 2013.

ALVES NETO, C. F.; VALADARES, G. V.; COSTA, L. S. DA. Revisão integrativa sobre a saúde da comunidade tradicional: | Revista Saúde e Meio Ambiente. **Revista Saúde e Meio Ambiente – RESMA**, v. 10, n. 1, 1 maio 2020.

AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil and Cedrela fissilis and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, p. 542–547, 2006.

AMCOFF, P. OECD SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT Number 34 - GUIDANCE DOCUMENT ON THE VALIDATION AND INTERNATIONAL ACCEPTANCE OF NEW OR UPDATED TEST METHODS FOR HAZARD ASSESSMENT. **Organisation for Economic Co-operation and Development**, 2005 ago. 2005.

AMÉRICO, Á. V. L. DOS S. et al. Efficacy of Phytopharmaceuticals From the Amazonian Plant Libidibia ferrea for Wound Healing in Dogs. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 7, p. 244, 12 jun. 2020.

ANDREA GONZALEZ ESCOBAR, N. et al. Sinopse das Caesalpinioideae (Leguminosae) na Serra do Japi, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**, v. 65, n. 3, p. 751–765, set. 2014.

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 02 DE 13 DE MAIO DE 2014. Diário Oficial da União - DOU**Brasil, 2 maio 2014a. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>. Acesso em: 18 abr. 2023

ANVISA; AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC nº 26, de 13 de maio de 2014 — Ministério da Saúde. Diário Oficial da União - DOU**, 13 maio 2014b. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt->

br/composicao/sectics/daf/pnpmf/orientacao-ao-prescritor/Publicacoes/resolucao-rdc-no-26-de-13-de-maio-de-2014.pdf/view>. Acesso em: 18 abr. 2023

ARAÚJO, A. L. DE et al. Effects of topical application of pure and ozonized andiroba oil on experimentally induced wounds in horses. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 54, n. 1, p. 66–74, 19 maio 2017.

ASSIS, F. F. V. DE et al. Antiplasmodial Activity of Hydroalcoholic Extract from Jucá (*Libidibia ferrea*) Pods. **Pharmaceutics**, v. 15, n. 4, p. 1162, 6 abr. 2023.

AWANG-JAMIL, Z. et al. Phytochemical analysis, antimicrobial and antioxidant activities of *Aidia borneensis* leaf extracts. **Journal of Applied Biology & Biotechnology**, v. 7, n. 5, p. 92–97, set. 2019.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Antiulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, v. 60, n. 2, p. 118–120, 1994.

BALBANI, A. P. S.; SILVA, D. H. S.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461–473, abr. 2009.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, v. 78, n. 5, p. 431–441, 22 dez. 2005.

BARDAJÍ, D. K. R. et al. *Copaifera reticulata* oleoresin: Chemical characterization and antibacterial properties against oral pathogens. **Anaerobe**, v. 40, p. 18–27, 1 ago. 2016.

BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v. 1, n. 01, p. 14–17, 30 jun. 2005.

BATTESTIN, V.; KATSUMI MATSUDA, L.; ALVES MACEDO, G. FONTES E APLICAÇÕES DE TANINOS E TANASES EM ALIMENTOS. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 15, n. 1, p. 63–72, 2004.

BEDNARCZUK, V. O. et al. TESTES IN VITRO E IN VIVO UTILIZADOS NA TRIAGEM TOXICOLÓGICA DE PRODUTOS NATURAIS. **Visão Acadêmica**, v. 11, n. 2, p. 43–50, 2010.

BIAVATTI, M. W. et al. Análise de óleos-resinas de copaíba: contribuição para o seu controle de qualidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 230–235, jun. 2006.

BIAVATTI, M. W. et al. Ethnopharmacognostic survey on botanical compendia for potential cosmeceutic species from Atlantic Forest. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 640–653, 2007.

BOELSTERLI, U. A. ANIMAL MODELS OF HUMAN DISEASE IN DRUG SAFETY ASSESSMENT. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 28, n. 3, p. 109–121, 2003.

BORELLA, J. C. et al. Avaliação da espalhabilidade e do teor de flavonoides em forma farmacêutica semissólida contendo extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). **Revista de Ciencias Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 31, n. 2, 2010.

BORGES, A. K. M. et al. Natural remedies for animal health in latin America. **Ethnoveterinary Medicine: Present and Future Concepts**, p. 311–344, 1 jan. 2019.

BRANDÃO, A. F. Diálogos das grandezas do Brasil. **Edições do Senado Federal**, v. 134, p. 338, 2010.

BRASIL. **Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1o do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei no 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. Diário Oficial da União (DOU)**, 9 out. 2008. Disponível em: <<https://legislacao.presidencia.gov.br/atos/?tipo=LEI&numero=11794&ano=2008&ato=57aQzYE5UNRpWT7e7>>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RESOLUÇÃO - RE Nº 1, DE 29 DE JULHO DE 2005. Determina a publicação do Guia para realização de Estudos de Estabilidade. Diário Oficial da União (DOU)**, 29 jul. 2005. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0001_29_07_2005.html>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Dispõe sobre a aprovação do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, 2ª edição. - RESOLUÇÃO RDC Nº 463, DE 27 DE JANEIRO DE 2021. DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO**, 27 jan. 2021. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/resolucao-rdc-n-463-de-27-de-janeiro-de-2021-302030067>>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 305, DE 14 DE NOVEMBRO DE 2002. Dispõe sobre a importação dos produtos para uso em seres humanos contendo matéria-prima obtida de tecidos/fluidos de animais ruminantes das espécies bovina, ovina, caprina, bubalina e de ruminantes silvestres. . Diário Oficial da União (DOU)**, 18 nov. 2002. Disponível em: <<http://www.ibama.gov.br/sophia/cnia/legislacao/AGENCIAS/ANVISA/RS0305-141102.PDF>>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 5, DE 11 DE DEZEMBRO DE 2008. Determina a publicação da “LISTA DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS DE REGISTRO SIMPLIFICADO”. . Diário Oficial da União (DOU)**, 12 dez. 2008. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/int0005_11_12_2008.html>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RESOLUÇÃO Nº 37, DE 6 DE JULHO DE 2009. Trata da admissibilidade das Farmacopéias estrangeiras. Diário Oficial da União (DOU)**, 8 jul. 2009. Disponível em:

<https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2009/res0037_06_07_2009.html>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para Avaliação de Segurança de Produtos Cosméticos.pdf — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, 2012. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/cosmeticos/manuais-e-guias/guia-para-avaliacao-de-seguranca-de-produtos-cosmeticos.pdf/view>>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos - Versão 2.pdf — Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa. Agência nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa.**, 31 jan. 2013. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/centraisdeconteudo/publicacoes/medicamentos/pesquisa-clinica/manuais-e-guias/guia-para-a-conducao-de-estudos-nao-clinicos-de-toxicologia-e-seguranca-farmacologica-necessarios-ao-desenvolvimento-de-medicamentos-versao-2.pdf/view>>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 04, DE 18 DE JUNHO DE 2014. Determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico. Diário Oficial da União (DOU)**, 20 jun. 2014. Disponível em: <https://fitoterapiabrasil.com.br/sites/default/files/legislacao/in_4_2014.pdf>. Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº. 84, DE 17 DE JUNHO DE 2016. Aprova o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira e dá outras providências. . Diário Oficial da União (DOU)**, 20 jun. 2016. . Acesso em: 22 fev. 2023

BRASIL; ANVISA - AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução - RDC Nº 35, de 7 de Agosto de 2015 - ANVISA. Diário Oficial da União -DOU**, 7 ago. 2015. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-rdc-no-35-de-7-de-agosto-de-2015-anvisa.pdf/view>>. Acesso em: 17 abr. 2023

BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA, R. et al. Avaliação in vitro da atividade antibacteriana de um cimento odontológico à base de óleo-resina de Copaifera multijuga Hayne. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. SUPPL., p. 733–738, 2008.

BRASIL, M. DA C. TECNOLOGIA E I. **Resolução CONCEA Nº 56 DE 05/10/2022 - Federal - LegisWeb. Diário Oficial da União - DOU**, 5 out. 2022. Disponível em: <<https://www.legisweb.com.br/legislacao/?id=437108>>. Acesso em: 17 abr. 2023

BRASIL; MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, T. E I.-M. **MCTI. Diário Oficial da União - DOUSedção** I, , 24 set. 2014. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/outros_atos/resolucoes/migracao/Resolucao_Normativa_CONCEA_n_18_de_24092014.html>. Acesso em: 17 abr. 2023

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica**. Ministério da Saúde ed. [s.l: s.n.]. v. 31

BRASIL; MINISTÉRIO DE CIÊNCIA, T. E I. **Portaria MCTI nº 491, de 03 de Julho de 2012. Institui a Rede Nacional de Métodos Alternativos - RENAMA e sua estrutura no âmbito do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação - MCTI, que será supervisionada por um Conselho Diretor. Diário Oficial da União (DOU)**, 5 jul. 2012. Disponível em: <https://antigo.mctic.gov.br/mctic/opencms/legislacao/portarias/migracao/Portaria_MCTI_n_491_de_03072012.html>. Acesso em: 22 fev. 2023

BREITBACH, U. B. et al. Amazonian Brazilian medicinal plants described by C.F.P. von Martius in the 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 147, n. 1, p. 180–189, 2 maio 2013.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. DE M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu - Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 17, n. 10, p. 2675–2685, out. 2012.

CABRAL, E. C. et al. Typification and quality control of the Andiroba (*Carapa guianensis*) oil via mass spectrometry fingerprinting. **Analytical Methods**, v. 5, n. 6, p. 1385–1391, 1 mar. 2013.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179–189, 2000.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016.

CARDOSO, D. et al. Amazon plant diversity revealed by a taxonomically verified species list. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 40, p. 10695–10700, 3 out. 2017.

CARMONA, G. B. et al. Effect of andiroba oil on periodontitis in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 28, n. 6, p. 430–434, 2013.

CARNEIRO, F. M. et al. TENDÊNCIAS DOS ESTUDOS COM PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL | Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais (2238-3565). **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CARNEIRO, L. J. et al. Copaifera multijuga, Copaifera pubiflora and Copaifera trapezifolia Oleoresins: Chemical Characterization and in vitro Cytotoxic Potential against Tumoral Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 31, n. 8, p. 1679–1689, 27 jul. 2020.

CARVALHO, A. C. B. et al. The Brazilian market of herbal medicinal products and the impacts of the new legislation on traditional medicines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 212, p. 29–35, 15 fev. 2018.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos: anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Tecmedd ed. [s.l: s.n.]. v. 1

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. **Embrapa - Espécies Arbóreas Brasileiras: Fabaceae ou Leguminosae**. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/agencia-de-informacao-tecnologica/tematicas/especies-arboreas-brasileiras/fabaceae>>. Acesso em: 21 fev. 2023.

CAVALHEIRO, M. G. et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de Caesalpinia ferrea Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2 B, p. 586–591, 2009.

CECHINEL-ZANCHETT, C. C. LEGISLAÇÃO E CONTROLE DE QUALIDADE DE MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS NOS PAÍSES DO MERCOSUL. **Infarma - Ciências Farmacêuticas**, v. 28, n. 3, p. 123–139, 30 set. 2016.

CHORILLI, M. et al. Ensaios biológicos para avaliação de segurança de produtos cosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 19–30, 25 maio 2009.

CLSI. **Methods for Dilution Susceptibility Test for Bacteria That Grow Aerobically, Approved Standard - 7th Edition**. [s.l: s.n.]. v. 26 (2)

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **RESOLUÇÃO NORMATIVA Nº 17, DE 3 DE JULHO DE 2014..pdf — Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação. Diário Oficial da União**, 4 jul. 2014a. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-17-de-3-de-julho-de-2014.pdf/view>>. Acesso em: 23 fev. 2023

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução normativa nº 18, de 24 de setembro de 2014. Reconhece métodos alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil, nos termos da Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014, e dá outras providências. Diário Oficial da União**, 25 set. 2014b. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/composicao/conselhos/concea/arquivos/arquivo/legislacao/resolucao-normativa-no-18-de-24-de-setembro-de-2014.pdf>>. Acesso em: 23 fev. 2023

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **Resolução normativa nº 31, de 18 de agosto de 2016. Reconhece métodos**

alternativos ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. **Diário Oficial da União**, p. 04, 19 ago. 2016.

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **RESOLUÇÃO N° 37, DE 15 DE FEVEREIRO DE 2018. Baixa a Diretriz da Prática de Eutanásia do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - Concea. Diário Oficial da União**, 21 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.gov.br/mcti/pt-br/acompanhe-o-mcti/concea/arquivos/pdf/legislacao/resolucao-normativa-no-37-de-15-de-fevereiro-de-2018.pdf/view>>. Acesso em: 23 fev. 2023

CONCEA. CONSELHO NACIONAL DE CONTROLE DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL. **RESOLUÇÃO N° 45, DE 22 DE OUTUBRO DE 2019. Reconhece método alternativo ao uso de animais em atividades de pesquisa no Brasil. Diário Oficial da União** Seção 1, , 25 out. 2019. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-n-45-de-22-de-outubro-de-2019-223849135>>. Acesso em: 23 fev. 2023

CONDE, N. C. O. et al. Revista Odonto Ciência In vitro antimicrobial activity of plants of the Amazon on oral biofilm micro-organisms. **Revista Odonto Ciencia**, v. 30, n. 4, p. 179–183, 2015.

CORRÊA, J. M. X. et al. Tratamento de ferida cirúrgica cutânea em ratos com óleo-resina de copaíba (copaíba reticulata). **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 28, n. 4, p. 184–189, 2021.

CORREA, M. P. **Diccionario das plantas uteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1931.

COSTA, J. et al. Métodos alternativos in vitro e in silico: métodos auxiliares e substitutivos à experimentação animal. **academia.edu**, n. 2, p. 36–57, 2014.

COSTA, R. S. T.; MARTINS, D. Uma revisão bibliográfica das atividades farmacológicas e substâncias isoladas da Carapa procera. **Scientia Amazonia**, v. 6, n. 1, p. 54–60, 2017.

COSTA-SILVA, J. H. et al. A toxicological evaluation of the effect of Carapa guianensis Aublet on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, n. 1, p. 122–126, 30 maio 2007.

COSTA-SILVA, J. H. et al. Acute and subacute toxicity of the Carapa guianensis Aublet (Meliaceae) seed oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, n. 3, p. 495–500, 28 mar. 2008.

CRISTINA VERRENGIA, E.; ALESSANDRA TORQUETE KINOSHITA, S.; LANE AMADEI RESUMO, J. Medicamentos Fitoterápicos no Tratamento da Obesidade. **UNICIÊNCIAS**, v. 17, n. 1, p. 53–58, 2013.

DALBEN, D.; EMMEL, J. L. A Lei Arouca e os direitos dos animais utilizados em experimentos científicos. **Revista Eletrônica de Iniciação Científica**, v. 4, n. 4, p. 280–291, 2013.

DALRYMPLE, D. G. *Artemisia annua*, artemisinin, ACTs and malaria control in Africa: tradition, science and public policy. **Artemisia annua, artemisinin, ACTs and malaria control in Africa: tradition, science and public policy.**, 2013.

DAS, U. N. Arachidonic acid and other unsaturated fatty acids and some of their metabolites function as endogenous antimicrobial molecules: A review. **Journal of Advanced Research**, v. 11, p. 57–66, 1 maio 2018.

DE ALENCAR FERREIRA, J. V. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Rev. cuba. plantas med**, p. 71–82, 2016.

DE ARAÚJO, A. A. et al. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibia ferrea*, *Parapiptadenia rigida* and *Psidium guajava*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 88–96, 28 out. 2014.

DE FIGUEREDO, C. A.; GURGEL, I. G. D.; GURGEL JUNIOR, G. D. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

DE LIMA, T. C. P. et al. DESENVOLVIMENTO DE NANOGEL DE *Copaifera reticulata* SOBRE A LESÃO MUSCULAR EM RATOS USANDO FONOFORESE. **Saude e Pesquisa**, v. 13, n. 1, p. 181–192, abr. 2020.

DENISE, C. et al. The medicinal use of *Carapa guianensis* Abul. (Andiroba). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e391101522815–e391101522815, 28 nov. 2021.

DEROUICHE, M. T. T.; ABDENNOUR, S. HET-CAM test. Application to shampoos in developing countries. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 393–396, 1 dez. 2017.

DE SOUZA, A. B. et al. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 380–383, 2006.

DE SOUZA, G. A. G. et al. In vitro and in vivo antimalarial potential of oleoresin obtained from *Copaifera reticulata* Ducke (Fabaceae) in the Brazilian Amazon rainforest. **Phytomedicine**, v. 24, p. 111–118, 15 jan. 2017.

DEUS, R. J. A.; ALVES, C. N.; ARRUDA, M. S. P. Avaliação do efeito antifúngico do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 1, p. 01–07, 2011.

DIAS, A. M. A. et al. Wound dressings loaded with an anti-inflammatory jucá (*Libidibia ferrea*) extract using supercritical carbon dioxide technology. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 74, p. 34–45, 1 fev. 2013.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A Historical Overview of Natural Products in Drug Discovery. **Metabolites** 2012, Vol. 2, Pages 303–336, v. 2, n. 2, p. 303–336, 16 abr. 2012.

DIAS, K. K. B. et al. Biological activities from andiroba (*Carapa guianensis* Aublet.) and its biotechnological applications: A systematic review. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 16, n. 4, p. 104629, 1 abr. 2023.

DRAIZE, J. et al. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. **J. Pharmacol. Exp.**, 1944.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 1 out. 2016.

EBERLIN, S. et al. Métodos Alternativos para Avaliação de Segurança de Produtos no Brasil. **Cosmetics & Toiletries (Brasil)**, v. 31, p. 18–26, 2019.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. SUPPL. 1, p. 69–75, 2001.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química nova escola**, v. 39, n. 2, p. 120–130, maio 2017.

FERNANDES, T. M. Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil. **Plantas medicinais: memória da ciência no Brasil**, 2003.

FERNÁNDEZ-FERREIRO, A. et al. Análisis de la toxicidad ocular de los colirios de voriconazol y fluconazol con HET-CAM. **Farmacia Hospitalaria**, v. 38, n. 4, p. 300–304, 2014.

FERNANDO BRASILEIRO DE VASCONCELOS, C. et al. Chronic toxicological study of the stem bark aqueous extract from *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. Estudo toxicológico crônico do extrato aquoso da casca do caule de *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. **Biopharmaceutical Sciences | Ciências Biofarmacêuticas Biomed Biopharm Res**, v. 17, n. 2, p. 277–293, 2020.

FERRAZ, I. D. K.; CAMARGO, J. L. C.; SAMPAIO, P. DE T. B. Sementes e plântulas de andiroba (*Carapa guianensis* Aubl. e *Carapa procera* DC): aspectos botânicos, ecológicos e tecnológicos. **SciELO Brasil**, v. 32, n. 4, p. 647–662, 2002.

FERREIRA, E. E.; CARVALHO, E. DOS S.; SANT'ANNA, C. DE C. The importance of using herbal medicines as an alternative or complementary practice in primary care: literature review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 1, p. e44611124643–e44611124643, 11 jan. 2022.

FERREIRA, M. R. A. et al. Chromatographic and Spectrophotometric Analysis of Phenolic Compounds from Fruits of *Libidibia ferrea* Martius. **Pharmacognosy Magazine**, v. 12, n. Suppl 2, p. 285, 2016.

FERREIRA, M. R. A.; SOARES*, L. A. L. *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L. P. Queiroz: A review of the biological activities and phytochemical composition. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 5, p. 140–150, 3 fev. 2015.

FERREIRA, S. H.; BARATA, L. E. S. **MEDICAMENTOS A PARTIR DE PLANTAS MEDICINAIS NO BRASIL Equipe Principal**. Acad. Bras. Ciências ed. [s.l.] 1998, 1998.

FILHO, R. B. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

FRANÇA, E. DE; VASCONCELLOS, A. G. PATENTES DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL: UMA ANÁLISE DO ANDAMENTO DOS PEDIDOS NO PERÍODO DE 1995-2017. **Cadernos de Ciência & Tecnologia**, v. 35, n. 3, p. 329–359, 23 jan. 2019.

FRANCOMANO, F. et al. β -Caryophyllene: A Sesquiterpene with Countless Biological Properties. **Applied Sciences** 2019, Vol. 9, Page 5420, v. 9, n. 24, p. 5420, 11 dez. 2019.

FREIRE, C. DE J. et al. Fitoterapia em pediatria: a produção de saberes e práticas na Atenção Básica. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v. 71, p. 637–645, 2018.

GALVÃO, J. M. et al. Avaliação do potencial de nefrotoxicidade ocasionado pelo uso do Óleo de Copaíba em ratos / Evaluation of the potential of nefrotoxicity occasioned by the use of Copaíba oil in rats. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 6, 2020.

GARCIA, D.; LIMA, W. C. EXPERIMENTOS CIENTÍFICOS COM ANIMAIS E SEUS ASPECTOS BIOÉTICOS E JURÍDICOS. **Revista de Estudos Jurídicos do UNI-RN**, n. 2, p. 74–74, 2018.

GARCIA, R. F.; YAMAGUCHI, M. H. Óleo de Copaíba e Suas Propriedades Medicinais: Revisão Bibliográfica. **Saúde e Pesquisa**, v. 5, n. 1, 19 mar. 2012.

GASTALDELLO RANDO, J. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Leguminosae–“Caesalpinioideae”. **revistas.usp.br**, n. 2, p. 141–198, 2013.

GILBERT, B.; FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. INSTITUTO DE TECNOLOGIA EM FÁRMACOS. DEPARTAMENTO DE PRODUTOS NATURAIS. RIO DE JANEIRO, R. BRASIL. Produtos Naturais Industrializáveis da Amazônia. v. 2, n. 2, 2006.

GOLDIN, L. A. DE M. et al. Polymyxin Acute Kidney Injury: a case of severe tubulopathy. **Brazilian Journal of Nephrology**, v. 44, n. 1, p. 112–115, 23 abr. 2021.

GOMES, N. M. et al. Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 486–492, 12 fev. 2007.

GONÇALVES, D. C. M. et al. Aspectos Mercadológicos dos Produtos não Madeireiros na Economia de Santarém-Pará, Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 19, n. 1, p. 9–16, 3 jan. 2012.

GONG, X. et al. Lyotropic Liquid Crystalline Self-Assembly Material Behavior and Nanoparticulate Dispersions of a Phytanyl Pro-Drug Analogue of CapecitabineAA Chemotherapy Agent. **ACS Appl. Mater. Interfaces**, v. 3, p. 1552–1561, 2011.

GONZÁLEZ MARTÍN, CARMEN. Del veneno al nanotóxico: ¿dosis sola facit venenum?. 5 dez. 2017.

GUILHON-SIMPLICIO, F. et al. Libidibia ferrea (Mart. Ex tul) L. P. Queiroz var. Ferrea: Pharmacological, phytochemical and botanical aspects Phytochemistry View project Pharmaceutical care View project LIBIDIBIA FERREA (MART. EX TUL) L. P. QUEIROZ VAR. FERREA: PHARMACOLOGICAL, PHYTOCHEMICAL AND BOTANICAL ASPECTS. **Article in International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, 2015.

GUIMARÃES, D. O.; DA SILVA MOMESSO, L.; PUPO, M. T. **Antibióticos: Importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes**. Química Nova, 2010.

HASENCLEVER, L. et al. A indústria de fitoterápicos brasileira: desafios e oportunidades. **Ciência e Saúde Coletiva**, v. 22, n. 8, p. 2559–2569, 2017.

HECK, M. C. et al. IMPORTÂNCIA DO ÓLEO DE Copaifera sp. (COPAÍBA). **SaBios-Revista de Saúde e Biologia**, v. 7, n. 1, p. 82–90, 27 abr. 2012.

HECK, R. M.; RIBEIRO, M. V.; BARBIERI, R. L. **Plantas medicinais do bioma pampa no cuidado em saúde**. Brasília, DF: Embrapa, 2017.

HIURA, A. L. et al. Características morfológicas de espécies arbóreas na floresta de várzea da APA da Fazendinha, Macapá/AP. **Revista Pesquisa & Iniciação Científica - Amapá**, v. 1, p. 35–39, 2008.

HUANG, C. B. et al. Short- and medium-chain fatty acids exhibit antimicrobial activity for oral microorganisms. **Archives of Oral Biology**, v. 56, n. 7, p. 650–654, 1 jul. 2011.

IBIAPINA, W. V. et al. INSERÇÃO DA FITOTERAPIA NA ATENÇÃO PRIMÁRIA AOS USUÁRIOS DO SUS. **Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança**, v. 12, n. 1, p. 60–70, 15 jun. 2014.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. **ICCVAM Test Method Evaluation Report: Current Validation Status of In Vitro Test Methods Proposed for Identifying Eye Injury Hazard Potential of Chemicals and Product - NIH Publication No. 10-7553**. ICCVAM, 2010. Disponível em: <<http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/ocutox/MildMod-TMER.htm>>. Acesso em: 21 fev. 2023

IHA, O. K. et al. Potential application of Terminalia catappa L. and Carapa guianensis oils for biofuel production: Physical-chemical properties of neat vegetable oils, their methyl-esters and bio-oils (hydrocarbons). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 95–98, 1 jan. 2014.

IZUMI, E. et al. Toxicity of Oleoresins from the Genus Copaifera in Trypanosoma cruzi: A Comparative Study. **Planta Med**, v. 79, p. 953–958, 2013.

JACQUES, A. C.; ZAMBIAZI, R. C. Fitoquímicos em amora-preta (Rubus spp). **Semina: Ciências Agrárias. Universidade Estadual de Londrina**, v. 32, n. 1, p. 245–259, 2011.

JESUS-BARROS, C. R. et al. REGISTRO DA OCORRÊNCIA DE *Hypsipylaferrealis* e *Hypsipyla grandella* (LEPIDOPTERA: PYRALIDAE) EM FRUTOS DE ANDIROBEIRAS (*Carapaguianensis*, MELIACEAE) EM MACAPÁ - AP, BRASIL. **Ciência Florestal**, v. 25, n. 3, p. 765–769, 1 jul. 2015.

JÚNIOR, J. G. DE P.; SOUZA, C. L. L. DE. Medicinal plants used in the Amazon region: a systematic review. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 14, p. e163101419965–e163101419965, 29 out. 2021.

JÚNIOR, J. S. DE A. et al. Anti-Inflammatory Potential of the Oleoresin from the Amazonian Tree *Copaifera reticulata* with an Unusual Chemical Composition in Rats. **Veterinary Sciences** 2021, Vol. 8, Page 320, v. 8, n. 12, p. 320, 10 dez. 2021.

KENFACK, D. Resurrection in *Carapa* (Meliaceae): a reassessment of morphological variation and species boundaries using multivariate methods in a phylogenetic context. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 165, n. 2, p. 186–221, 1 fev. 2011.

KFFURI, C. W. et al. FITONÍMIA NHEENGATU DE PLANTAS UTILIZADAS NO TRATAMENTO DA MALÁRIA NO ALTO RIO NEGRO – AMAZÔNIA BRASILEIRA. **Ethnoscintia - Brazilian Journal of Ethnobiology and Ethnoecology**, v. 5, n. 1, 31 dez. 2020.

KITAOKA, N. et al. The Application of Synthetic Biology to Elucidation of Plant Mono-, Sesqui-, and Diterpenoid Metabolism. **Molecular Plant**, v. 8, n. 1, p. 6–16, 5 jan. 2015.

KLEIN, T. et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, 1 set. 2009.

KOBAYASHI, C. et al. Pharmacological evaluation of *Copaifera multijuga* oil in rats. <https://doi.org/10.3109/13880209.2010.515595>, v. 49, n. 3, p. 306–313, mar. 2011.

KOBAYASHI, Y. T. DA S. et al. Phytochemical evaluation and wound healing potential of the fruit extract ethanolic of Jucá (*Libidibia ferrea*) in Wistar rats. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 1, p. 34–40, 13 abr. 2015.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery** 2005 4:3, v. 4, n. 3, p. 206–220, 24 fev. 2005.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 2013, n. 03, p. 17–31, 24 jun. 2013.

LAUTIÉ, E. et al. Unraveling Plant Natural Chemical Diversity for Drug Discovery Purposes. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 397, 7 abr. 2020.

LEMES, S. R. et al. Antigenotoxicity protection of *Carapa guianensis* oil against mitomycin C and cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, n. 3, p. 2043–2051, 29 jun. 2017.

LIMA, C. M. et al. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 7 abr. 2014.

- LIMA, M. C. F. DE et al. Quantificação do β -cariofileno e óxido de cariofileno para o controle de qualidade dos óleos de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne)/ Quantification of β -caryophyllene and caryophyllene oxide for quality control of copaiba oils (*Copaifera multijuga* Hayne). **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 1, p. 608–623, 7 jan. 2020.
- LIMA, G. et al. Concomitant use of anxiolytics and medicinal plants: Is there a risk? **Research, Society and Development**, v. 11, n. 7, p. e59711730219–e59711730219, 5 jun. 2022.
- LIVIAC, D. et al. Phytochemical Analysis, In vitro Antioxidant Capacity and Toxicity Assessment of *Copaifera paupera* Oleoresin. **Pharmacognosy Journal**, v. 11, n. 2, p. 374–378, 1 abr. 2019.
- LOPES DE SOUSA, R. et al. ÓLEO DE ANDIROBA: EXTRAÇÃO, COMERCIALIZAÇÃO E USOS TRADICIONAIS NA COMUNIDADE MAMANGAL, IGARAPÉ-MIRI, PARÁ. **Biodiversidade**, v. 18, n. 1, 21 abr. 2019.
- LOPES, K. M. T.; NASCIMENTO, P. R.; 2017, UNDEFINED. Cultura Popular e Ciência no Registro de Fitoterápicos. **Revinter**, v. 10, n. 02, p. 122–133, jun. 2017.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. DE A. Plantas medicinais no Brasil : nativas e exóticas. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, n. 85-86714-28–3, 2008.
- LOURENÇO, A. C. S. et al. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embrionário fetal. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 407–413, 2009.
- LUCINDA, L. M. F. et al. Assessment of sperm production and reproductive organs of Wistar rats to long-term exposure of *Caesalpinia ferrea*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, n. 4, p. 907–914, 2010.
- LUIZ, W. et al. Fitoterapia popular na Amazônia Paraense: uma abordagem no município de Igarapé-Miri, estado do Pará nos anos de 2000 e 2008. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, n. 2, p. 305–311, 1 abr. 2014.
- MACÊDO, N. S. et al. *Caesalpinia ferrea* C. Mart. (Fabaceae) Phytochemistry, Ethnobotany, and Bioactivities: A Review. **Molecules** **2020**, Vol. **25**, Page **3831**, v. 25, n. 17, p. 3831, 23 ago. 2020.
- MACHADO, I. R.; MENDES, K. R. Ethnobotanical, Medical, Therapeutical and Pharmacological Study of *Carapa guianensis* Aublet – a Review. **Biodiversidade Brasileira - BioBrasil**, v. 11, n. 1, p. 1–24, 2 jun. 2021.
- MAHAMA, A. et al. Assessment of toxicity and anti-plasmodial activities of chloroform fractions of *Carapa procera* and *Alchornea cordifolia* in murine models. **Frontiers in Pharmacology**, v. 13, 23 dez. 2022.
- MAIA, I. DE C.; SOARES, V. C. G.; PEREIRA, P. M. P. Analysis of studies of applications therapeutic of *Carapa guianensis* Aublet (MELIACEAE). **Unisanta BioScience**, v. 11, n. 1, p. 50–69, 18 mar. 2022.

MAISTRO, E. L. et al. In vivo evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, v. 28, n. 4, p. 833–838, 2005.

MALHEIROS, D. F. et al. Nanoemulsions with oleoresin of *Copaifera reticulata* (Leguminosae) improve anthelmintic efficacy in the control of monogenean parasites when compared to oleoresin without nanoformulation. **Journal of Fish Diseases**, v. 43, n. 6, p. 687–695, 1 jun. 2020.

MARIANA G. CAVALHEIRO et al. Atividades biológicas e enzimáticas do extrato aquoso de sementes de *Caesalpinia ferrea* Mart., Leguminosae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 586–591, 30 jun. 2009.

MARQUES, L. C.; SOUZA, C. M. Pesquisa e Desenvolvimento de Fitoterápicos: Relatos de Experiência em Indústria Farmacêutica Nacional. **Revista Fitos**, v. 7, n. 01, p. 50–66, 31 mar. 2012.

MARTIM, J. K. P.; MARANHO, L. T.; COSTA-CASAGRANDE, T. A. Review: Role of the chemical compounds present in the essential oil and in the extract of *Cordia verbenacea* DC as an anti-inflammatory, antimicrobial and healing product. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 265, p. 113300, 30 jan. 2021.

MELO, K. M. et al. Evaluation of the Genotoxic and Antigenotoxic Effects of Andiroba (*Carapa guianensis* Aublet) Oil and Nanoemulsion on Swiss Mice. **Journal of Nanomaterials**, v. 2018, 2018.

MENDONÇA, A. M. et al. Extração de óleo de andiroba por prensa: rendimento e qualidade de óleo de sementes submetidas a diferentes teores de água e temperaturas de secagem Extraction of andiroba oil by press: yield and quality of seed oil submitted to different moisture and drying temperatures. **Scientia Forestalis**, v. 48, n. 125, p. 1–9, 2020.

MENDONÇA, A. P.; FERRAZ, I. D. K. Óleo de andiroba: processo tradicional da extração, uso e aspectos sociais no estado do Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, v. 37, n. 3, p. 353–364, 2007.

MENDONÇA, D. E.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba - *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, p. 577–581, jun. 2009.

MENGUE, S. S.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, p. 21–35, 2001.

MIGUEL, M. A. C. **Estudo dos óleos naturais frente à *Paracoccidioides* spp.: atividade biológica de óleos de copaíba in natura e imobilizado em micelas.** Goiânia: UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS, abr. 2017.

MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R. et al. Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet) Nanoemulsions: Development and Assessment of Cytotoxicity, Genotoxicity, and Hematotoxicity. **Journal of Nanomaterials**, v. 2017, 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE - MS. **Plantas Medicinais de Interesse ao SUS – Rénisus — Ministério da Saúde. Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rénisus)** Brasil Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (Rénisus), , 9 ago. 2022. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/composicao/sectics/daf/pnppmf/ppnppmf/renisus>>.

Acesso em: 15 fev. 2023

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. **Avaliação da atividade antiplasmodica in vitro dos óleos de Andiroba (Carapa guianensis Aubl.) e Pimenta-de-macaco (Piper aduncum L).** Disponível em:

<https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/UFPA_38e64a2b775f6fd7199a6c0b3d2b122f>.

Acesso em: 19 jan. 2023.

MIRANDA JÚNIOR, R. N. C. et al. Antiplasmodial activity of the andiroba (Carapa guianensis Aubl., Meliaceae) oil and its limonoid-rich fraction. 2012.

MONTES, L. V. et al. Evidências para o uso da óleo-resina de copaíba na cicatrização de ferida – uma revisão sistemática. **Natureza on line**, v. 7, p. 61–67, 2009.

MORS, W. B.; RIZZINI, C. T. Useful plants of Brazil. **Useful plants of Brazil.**, v. 14, p. 01–363, 1966.

NARDI, M. et al. Artisanal Extraction and Traditional Knowledge Associated with Medicinal Use of Crabwood Oil (Carapa guianensis Aublet.) in a Peri-Urban Várzea Environment in the Amazon Estuary. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

NASCIMENTO, G. O. et al. Lipidomic profiles from seed oil of Carapa guianensis Aubl. and Carapa vasquezii Kenfack and implications for the control of phytopathogenic fungi. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 67–73, 1 mar. 2019.

NAYAK, B. S. et al. Investigation of the Wound Healing Activity of Carapa guianensis L. (Meliaceae) Bark Extract in Rats Using Excision, Incision, and Dead Space Wound Models. <https://home.liebertpub.com/jmf>, v. 13, n. 5, p. 1141–1146, 1 out. 2010.

NINOMIYA, K. et al. Hepatoprotective Limonoids from Andiroba (Carapa guianensis). **International Journal of Molecular Sciences** 2016, Vol. 17, Page 591, v. 17, n. 4, p. 591, 19 abr. 2016.

NÓBREGA, A. M. DA et al. Determination of eye Irritation Potential of Low-irritant Products: Comparison of in vitro Results with the in vivo Draize Rabbit Test . **Arch. Biol. Technol.** v, v. 55, n. 3, p. 381–388, 2012.

NOVELLO, Z. et al. Extraction, chemical characterization and antioxidant activity of andiroba seeds oil obtained from pressurized n-butane. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 697–701, 15 dez. 2015.

NUNES, K. M. et al. The Monoglyceride Content Affects the Self-Assembly Behavior, Rheological Properties, Syringeability, and Mucoadhesion of In Situ–Gelling Liquid Crystalline Phase. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 105, n. 8, 2016.

OCDE 263. GUIDANCE DOCUMENT NO 263 ON INTEGRATED APPROACHES TO TESTING AND ASSESSMENT (IATA) FOR SERIOUS EYE DAMAGE AND EYE IRRITATION. SERIES ON TESTING AND ASSESSMENT. **Organisation for Economic Co-operation and Development**, n. 2, p. 1–110, 25 maio 2017.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 410: Repeated Dose Dermal Toxicity: 21/28-day Study**. [s.l.] OECD, 1981.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method**. [s.l.] OECD, 2002.

OECD - ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. **Test No. 402: Acute Dermal Toxicity**. [s.l.] OECD, 2017.

OLIVEIRA DE ALENCAR MENEZES, T. et al. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 38, n. 3, p. 184–91, 2009.

OLIVEIRA, F. DE A. S. DE et al. Valores de referência de parâmetros bioquímicos e hematológicos de *Rattus norvegicus* (Wistar) da Unidade de Produção Animal do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos da Universidade Federal da Paraíba. **Scientia Plena**, v. 17, n. 3, 16 abr. 2021a.

OLIVEIRA, G. P. DE et al. Cytotoxicity of an orabase from *Libidibia Ferrea*. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e133101018713–e133101018713, 7 ago. 2021b.

OLIVEIRA, M. C. B. DE et al. Toxicity and antibacterial activity of medicinal plants used in the treatment of respiratory diseases: an integrative review. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e244997169–e244997169, 16 ago. 2020.

OLIVEIRA, R. X. DE et al. O uso de antimicrobianos na Atenção Primária à Saúde / The use of antimicrobials in primary health care. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 4, n. 1, p. 3048–3056, 18 fev. 2021c.

OLIVEIRA, E. C. P.; LAMEIRA, O. A.; ZOGHBI, M. G. B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju, PA. **Rev. Bras. Pl. Med**, n. 3, p. 14–23, 2016.

OLIVEIRA, F. G. DA S.; LEHN, C. R. Riscos e Perspectivas na Utilização de Fitoterápicos no Brasil. **Opará: Etnicidades, Movimentos Sociais e Educação**, v. 3, n. 4, p. 35–44, 21 dez. 2015.

OLIVEIRA, I. D. S. D. S. et al. Carapa guianensis Aublet (Andiroba) Seed Oil: Chemical Composition and Antileishmanial Activity of Limonoid-Rich Fractions. **BioMed Research International**, v. 2018, 2018.

PACHECO, R. T. et al. USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DA DEPRESSÃO E SEUS BENEFÍCIOS. **Revista Ibero-Americana de Humanidades, Ciências e Educação**, v. 7, n. 9, p. 643–651, 30 set. 2021.

PACHECO, T. A. R. C.; BARATA, L. E. S.; DUARTE, M. C. T. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera* spp) balsams. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, p. 123–124, 2006.

PACKER, J. F.; DA LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 102–107, 2007.

PAGANO, M.; FAGGIO, C. The use of erythrocyte fragility to assess xenobiotic cytotoxicity. **Cell Biochemistry and Function**, v. 33, n. 6, p. 351–355, 1 ago. 2015.

PAPE, W. J.; PFANNENBECKER, U.; HOPPE, U. Validation of the red blood cell test system as in vitro assay for the rapid screening of irritation potential of surfactants. **Molecular Toxicology**, v. 1, n. 4, p. 525–536, 1 set. 1987.

PAPHITOU, N. I. Antimicrobial resistance: action to combat the rising microbial challenges. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 42, n. SUPPL.1, p. S25–S28, 1 jun. 2013.

PARAENSE, N.; SANTOS, D. Theodoro Peckolt: a produção científica de um pioneiro da fitoquímica no Brasil. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, v. 12, n. 2, p. 515–533, ago. 2005.

PAUMGARTTEN, F. J. R. et al. Repelentes de mosquitos, eficácia para prevenção de doenças e segurança do uso na gravidez. **Vigilância Sanitária em Debate**, v. 4, n. 2, 31 maio 2016.

PECKOLT, T.; PECKOLT, G. **História das Plantas Úteis e Medicinais do Brasil**. [s.l.] Fino Traço Editora, 2016.

PEDRO, D. A. MÉTODOS ALTERNATIVOS AO USO DE ANIMAIS EM ENSINO E PESQUISA: EVOLUÇÃO E PANORAMA ATUAL DO BRASIL. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 18, n. 37, 29 set. 2021.

PEDROSO, R. D. S.; ANDRADE, G.; PIRES, R. H. Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 31, n. 2, p. 2021, 16 jul. 2021.

PERNA, T. A.; LAMANO-FERREIRA, A. P. DO N. Revisão Bibliométrica Sobre o Cultivo de Plantas Medicinais em Quintais Urbanos em Diferentes Regiões do Brasil (2009-2012). **Journal of Health Sciences**, v. 16, n. 1, p. 61–68, 2014.

PERON, L. M.; EBERLIN, M. N.; BARATA, L. E. S. B. **Avaliação dos limonóides presentes no resíduo industrial de andiroba (*Carapa guianensis*) usando cromatografia líquida de ultra eficiência acoplada à espectrometria de massas (CLUE-EM)**. Campinas, SP: Unicamp, 2017.

PETERS, V. M. et al. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Evaluation of reproductive toxicity of aqueous extract of the fruits from *Caesalpinia ferrea* Mart. in rats Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales. v. 7, n. 5, p. 268–272, 2008.

PIERI, F. A. et al. Avaliação do perfil antimicrobiano de dois óleos do gênero *Copaifera*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, n. 1, p. 241–244, fev. 2012.

PIERI, F. A.; MUSSI, M. C.; MOREIRA, M. A. S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 11, n. 4, p. 465–472, 2009.

PORFÍRIO-DIAS, C. L. et al. Andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl) shows cytotoxicity but no mutagenicity in the ACPPO2 gastric cancer cell line. **Journal of Applied Toxicology**, v. 40, n. 8, p. 1060–1066, 1 ago. 2020.

POURNAGHI, N. et al. A review of the genus *Caesalpinia* L.: emphasis on the cassane and norcassane compounds and cytotoxicity effects. **Journal of Medicinal Plants**, v. 19, n. 76, p. 1–20, 10 nov. 2020.

REBOREDO, M. DE M. et al. Avaliação da toxicidade do extrato aquoso de *Caesalpinia ferrea* em órgãos vitais, no sistema reprodutor e na produção de espermatozoides de ratos Wistar submetidos a tratamento subagudo. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução (Descontinuada)**, v. 26, n. 1/2, 2007.

RÊGO DA SILVA, K. M. et al. Evaluation of the antimicrobial activity of essential oil and parts fractions obtained from the species *Peltophorum dubium* and *Combretum leprosum*. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 10, p. e36111023450–e36111023450, 22 jul. 2022.

REIS, A. S.; SANTOS, A. S.; GONÇALVES, J. F. C. Ultrasound-assisted lipid extractions, enriched with sterols and tetranortriterpenoids, from *Carapa guianensis* seeds and the application of lipidomics using GC/MS. **RSC advances**, v. 11, p. 33160–33168, 30 ago. 2021.

RIBEIRO, C. D. B. et al. The medicinal use of *Carapa guianensis* Abul. (Andiroba). **Research, Society and Development**, v. 10, n. 15, p. e391101522815–e391101522815, 28 nov. 2021.

RIGAMONTE-AZEVEDO, O. C.; WADT, P. G. S.; WADT, L. H. D. O. Potencial de produção de óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp) de populações naturais do sudoeste da Amazônia. **Revista Árvore**, v. 30, n. 4, p. 583–591, 2006.

RIOS, M. N. DA S.; PASTORE JÚNIOR, F. **Repositório Institucional da UnB: Plantas da Amazônia : 450 espécies de uso geral**. UNB ed. Brasília: [s.n.]. v. 1

ROCHA, A. A. et al. AVALIAÇÃO IN VITRO DO EXTRATO DA *Carapa guianensis* (MELIACEAE) E DA *Uncaria guianensis* (RUBIACEAE) SOBRE *Malassezia pachydermatis* ISOLADA DE PRIMATAS NÃO HUMANOS NO ESTADO DO ACRE. **ENCICLOPEDIA BIOSFERA**, v. 17, n. 33, 30 set. 2020a.

ROCHA, C. A. M. DA et al. Prospecção Científica e Tecnológica do Ácido Caurenóico, um Diterpeno Bioativo. **Cadernos de Prospecção**, v. 13, n. 1, p. 256–256, 27 mar. 2020b.

ROCHA, L. P. B. DA et al. Use of medicinal plants: History and relevance. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282–e44101018282, 5 ago. 2021a.

ROCHA, L. P. B. DA et al. Use of medicinal plants: History and relevance. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e44101018282–e44101018282, 5 ago. 2021b.

RONDON, F. C. M. et al. In vitro efficacy of *Coriandrum sativum*, *Lippia sidoides* and *Copaifera reticulata* against *Leishmania chagasi*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 185–191, 2012.

ROY, A.; SARAF, S. Limonoids: Overview of Significant Bioactive Triterpenes Distributed in Plants Kingdom. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 2, p. 191–201, 2006.

SACHETTI, C. G. et al. Avaliação da toxicidade aguda e potencial neurotóxico do óleo-resina de copaíba (*Copaifera reticulata* Ducke, Fabaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 937–941, 2009.

SÁ, L. L. F. DE et al. REGULAMENTAÇÃO DE FITOTERÁPICOS NO BRASIL E PERFIL DAQUELES VENDIDOS EM UMA FARMÁCIA DE MANIPULAÇÃO DE TERESINA-PI. **Boletim Informativo Geum**, v. 9, n. 3, p. 1–9, 2018.

SAKAMOTO, A. et al. Andirolides Q–V from the flower of andiroba (*Carapa guianensis*, Meliaceae). **Fitoterapia**, v. 90, p. 20–29, 1 out. 2013.

SANTIAGO, K. B. et al. Immunomodulatory action of *Copaifera* spp oleoresins on cytokine production by human monocytes. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 70, n. C, p. 12–18, 1 mar. 2015.

SANTOS, D. G. et al. *Copaifera Reticulata*: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos de Alimentos *Copaifera Reticulata*: Chemical Characterization and Bactericidal Activity Against Pathogens in Foods Resumo. **Rev. Virtual Quim.**, v. 00, n. 00, p. 2–19, 2020a.

SANTOS, D. G. et al. *Copaifera Reticulata*: Caracterização Química e Atividade Bactericida Frente à Patógenos de Alimentos *Copaifera Reticulata*: Chemical Characterization and Bactericidal Activity Against Pathogens in Foods Resumo. **Revista Virtual de Química**, v. 12, n. 2, p. 2–19, 17 abr. 2020b.

SANTOS, D. L. et al. Ciências em Foco. **Ciências em Foco**, v. 12, n. 1, p. 86–95, 2 jun. 2019.

SANTOS, A. J. DOS; GUERRA, F. G. P. DE Q. ASPECTOS ECONÔMICOS DA CADEIA PRODUTIVA DOS ÓLEOS DE ANDIROBA (*Carapa guianensis* Aubl.) E COPAÍBA (*Copaifera multijuga* Hayne) NA FLORESTA NACIONAL DO TAPAJÓS – PARÁ. **FLORESTA**, v. 40, n. 1, p. 23, 25 mar. 2010.

SANTOS, N. P. DOS; PINTO, A. C.; ALENCASTRO, R. B. DE. Theodoro Peckolt: naturalista e farmacêutico do Brasil Imperial. **Química Nova**, v. 21, n. 5, p. 666–670, out. 1998.

SARQUIS, I. R. et al. Carapa guianensis Aubl. (Meliaceae) oil associated with silk fibroin, as alternative to traditional surfactants, and active against larvae of the vector Aedes aegypti. **Industrial Crops and Products**, v. 157, p. 112931, 1 dez. 2020.

SAWADA, L. A. et al. Libidibia ferrea mature seeds promote antinociceptive effect by peripheral and central pathway: Possible involvement of opioid and cholinergic receptors. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.

SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; COSTA-VAL, A. P. Mecanismos de ação de antimicrobianos e resistência bacteriana. **Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia**, v. 4, n. 13, p. 12–20, 2016.

SELVADOSS, P. P. et al. Enhancement of antimicrobial activity by liposomal oleic acid-loaded antibiotics for the treatment of multidrug-resistant Pseudomonas aeruginosa. <https://doi.org/10.1080/21691401.2017.1307209>, v. 46, n. 2, p. 268–273, 17 fev. 2017.

SENA DE SAN-MARTIN, B.; BARATA, L. ALTERNATIVE CONTROL OF Bemisia tabaci BOTYPE B AND PRELIMINARY TOXICITY OF LIMONOID CONCENTRATE OBTAINED FROM INDUSTRIAL SEED OF Capara guianensi Chemical studies on Rosewood species View project BIOACTIVE NATURAL PRODUCTS FROM INDUSTRIAL SUBPRODUCTS View project. 2019.

SILVA, C. S. M. et al. Wound Healing Activity of Topical Formulations Containing Mauritia flexuosa Oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 31, n. 2, p. 225–231, 1 abr. 2021a.

SILVA, J. J. M. DA et al. Reliable Methods for Analyses of Volatile Compounds of Copaifera Oleoresins Combining Headspace and Gas Chromatography. **Chemistry & Biodiversity**, v. 17, n. 1, p. e1900440, 1 jan. 2020.

SILVA, L. O. P. DA; NOGUEIRA, J. M. DA R. Resistência bacteriana: potencial de plantas medicinais como alternativa para antimicrobianos. **Rev. bras. anal. clin.**, v. 53, n. 1, p. 21–27, 2021.

SILVA, D. F. et al. PCL/Andiroba Oil (Carapa guianensis Aubl.) Hybrid Film for Wound Healing Applications. **Polymers 2021, Vol. 13, Page 1591**, v. 13, n. 10, p. 1591, 14 maio 2021b.

SILVA, F. R. P.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise Fitoquímica e Microbiológica da Atividade do Extrato Bruto Etanólico da Andiroba, Carapa guianensis Aubl. **Biota Amazônia**, v. 4, n. 4, 2014.

SILVA, L. R. PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E PERFIL DOS ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO DA ANDIROBA. **Nativa**, v. 6, n. 2, p. 147–152, 26 mar. 2018.

SILVA, M. A. C. et al. Acute and a 28-repeated dose toxicity study of commercial oleoresin from Copaifera sp. in rodents. **Advances in Traditional Medicine**, v. 22, n. 4, p. 739–747, 1 dez. 2022.

SILVA MEDEIROS, R.; VIEIRA, G. Sustainability of extraction and production of copaiba (*Copaifera multijuga* Hayne) oleoresin in Manaus, AM, Brazil. **Forest Ecology and Management**, v. 256, n. 3, p. 282–288, 30 jul. 2008.

SIMÕES, C. A. C. G. et al. Antibacterial Activity of Copaiba Oil Gel on Dental Biofilm. **The Open Dentistry Journal**, v. 10, n. Suppl-1, M6, p. 188–195, 12 maio 2016.

SINITOX. SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICOLÓGICAS. **Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas - Sinitox**. Disponível em: <<https://sinitox.icict.fiocruz.br/dados-nacionais>>. Acesso em: 14 fev. 2023.

SITAREK, P. et al. Potential Synergistic Action of Bioactive Compounds from Plant Extracts against Skin Infecting Microorganisms. **International Journal of Molecular Sciences** 2020, Vol. 21, Page 5105, v. 21, n. 14, p. 5105, 19 jul. 2020.

SOARES, A. DOS S. et al. Therapeutic effects of andiroba (*Carapa guianensis* Aubl) oil, compared to low power laser, on oral mucositis in children underwent chemotherapy: A clinical study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 264, p. 113365, 10 jan. 2021.

SOARES, M. R. P. S. et al. *In vitro* antifungal activity and cytotoxicity screening of dry crude extracts from Brazilian Amazonia plants. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines**, v. 15, n. 4, p. 13–21, 19 out. 2018.

SOBRINHO, R. M. R. et al. MAUS TRATOS AOS ANIMAIS ATRAVÉS DA EXPERIMENTAÇÃO CIENTÍFICA. **Revista do Curso de Direito do Centro Universitário Brazcubas**, v. 1, n. 1, 11 maio 2017.

SOUZA, B. A. A. DE et al. Effects of Andiroba oil (*Carapa guianensis*) on wound healing in alloxan-diabetic rats. **International Archives of Medicine**, v. 10, 28 out. 2017.

SOUZA, L. D. G. DE et al. Botanical, phytochemical and antimicrobial aspects of *Matricaria chamomilla* L. (Asteraceae): a brief review. **Research, Society and Development**, v. 11, n. 5, p. e53211528093–e53211528093, 15 abr. 2022.

SOUZA, R. L. DE; MESQUITA, F. R.; ALVES, W. F. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais de andiroba e copaíba e suas diferentes combinações no controle do fungo *Sclerotium rolfsii*. **Scientia Naturalis**, v. 1, n. 1, p. 17–25, 13 fev. 2019.

SOUZA, F. D. R.; HIGUCHI, N. O manejo da copaíba pelas etnias Arara e Gavião na Terra Indígena Igarapé Lourdes, Rondônia, Norte do Brasil. **Revista Ceres**, v. 61, n. 1, p. 28–34, 2014.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N.; PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 3, p. 435–440, 2010.

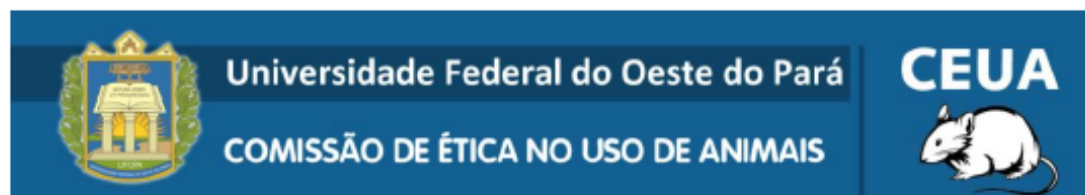
SUBRAMANIAN, K.; SANKARAMOURTHY, D.; GUNASEKARAN, M. Toxicity Studies Related to Medicinal Plants. **Natural Products and Drug Discovery: an Integrated Approach**, p. 491–505, 1 jan. 2018.

- SÜNTAR, I. Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. **Phytochemistry Reviews**, v. 19, n. 5, p. 1199–1209, 1 out. 2020.
- TANAKA, Y. et al. Absolute stereostructure of Andirolides A–G from the flower of *Carapa guianensis* (Meliaceae). **Tetrahedron**, v. 67, n. 4, p. 782–792, 28 jan. 2011.
- TOBOUTI, P. L. et al. Antimicrobial activity of copaiba oil: A review and a call for further research. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 94, p. 93–99, 1 out. 2017.
- TOLEDO, A. C. O. et al. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Lecta-USF**, p. 7–13, 2003.
- TUNDIS, R.; LOIZZO, M. R.; MENICHINI, F. An Overview on Chemical Aspects and Potential Health Benefits of Limonoids and Their Derivatives. <http://dx.doi.org/10.1080/10408398.2011.581400>, v. 54, n. 2, p. 225–250, jan. 2013.
- VALDIR, V. J.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera* L. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 273–286, 2002.
- VASCONCELOS, C. F. B. DE et al. Chronic toxicological study of the stem bark aqueous extract from *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. Estudo toxicológico crônico do extrato aquoso da casca do caule de *Libidibia ferrea* Mart. ex Tul. **Biopharmaceutical Sciences | Ciências Biofarmacêuticas Biomed Biopharm Res**, v. 17, n. 2, p. 277–293, 2020.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- VELOSO, D. J. et al. Potential antibacterial and anti-halitosis activity of medicinal plants against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 110, p. 104585, 1 fev. 2020.
- VENTER, N. G.; MONTE-ALTO-COSTA, A.; MARQUES, R. G. A new model for the standardization of experimental burn wounds. **Burns**, v. 41, n. 3, p. 542–547, 1 maio 2015.
- VIEGAS, C.; DA SILVA BOLZANI, V.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.
- WANZELER, A. M. V. et al. Therapeutic effect of andiroba oil (*Carapa guianensis* Aubl.) against oral mucositis: an experimental study in golden Syrian hamsters. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 5, p. 2069–2079, 1 jun. 2018.
- WHALEN, K.; FINKEL, R.; PANAVELIL, T. A. **Farmacologia Ilustrada**. [s.l.: s.n.].
- WOERDENBAG, H. J.; LUGT, C. B.; PRAS, N. *Artemisia annua* L.: a source of novel antimalarial drugs. **Pharmaceutisch Weekblad Scientific Edition**, v. 12, n. 5, p. 169–181, out. 1990.
- ZIECH, R. E. et al. Atividade antimicrobiana do oleorresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 33, n. 7, p. 909–913, 2013.

ANEXO I – Certificado do Comitê de Ética no Uso de Animais

09/05/2022 12:34

Certificado



CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo Nº 0320220198, intitulado PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOMEDICAMENTO COM BASE NA ANDIROBA, JUCÁ E COPAÍBA, sob a responsabilidade de Waldiney Pires Moraes, está de acordo com os Princípios éticos na Experimentação Animal adotados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), tendo sido aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA.

CERTIFICATE

We certify that the protocol Nº 0320220198, entitled "PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE FITOMEDICAMENTO COM BASE NA ANDIROBA, JUCÁ E COPAÍBA", is in agreement with the Ethical Principles for Animal Research established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA). This project was approved by the institutional Commission for Ethics in the Use of Animals of Universidade Federal do Oeste do Pará.

Santarém-PA, 09/05/2022

Profª. Dra. Adriana Caroprezzi Morini
Presidente

Verificar a autenticidade do certificado em <http://ufopa.edu.br/ceua/validar-certificado>