



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DAS
FLORES DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

MARCIA DE OLIVEIRA DA SILVA

Santarém, Pará
Janeiro, 2013

MARCIA DE OLIVEIRA DA SILVA

**ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DAS
FLORES DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen**

**ORIENTADOR: DR. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA
CO-ORIENTADORA: DRA. ROSA HELENA VERAS MOURÃO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia.

**Santarém, Pará
Janeiro, 2013**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Gestão da Informação – SIGI/UFOPA

S586a Silva, Marcia de Oliveira da
Atividade farmacológica e toxicológica das flores de *Acmella oleracea*
(L.) R. K. Jasen / Marcia de Oliveira da Silva. – Santarém, 2013.
87 f.: il.
Inclui bibliografias.

Orientador Ricardo Bezerra de Oliveira, Co-orientadora Rosa Helena Veras Mourão.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Santarém, 2013.

1. Plantas medicinais. 2. Hortaliças. 3. *Acmella oleracea* (Jambú). 4. Toxicologia. I. Oliveira, Ricardo Bezerra de, orient. II. Título.

CDD: 23 ed. 615.32399

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DAS FLORES DE *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de Mestre em Recursos Naturais da Amazônia, área de concentração: Bioprospecção e Manejo de recursos naturais da Amazônia. Aprovada pelo Programa de Pós-graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia – PGRNA, nível de mestrado, da Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, em 29 de janeiro de 2013.

Prof. Dr. Luís Reginaldo Ribeiro Rodrigues
Coordenador do PGRNA

Apresenta a comissão examinadora, integrada pelos professores:

Prof. Dr. PERGENTINO JOSÉ CUNHA DE SOUSA
Universidade Federal do Pará - UFPA
Examinador 01

Prof^a. Dr^a. HONORLY KÁTIA MESTRE CORRÊA
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Examinador 02

Prof^a. Dr^a. SORAIA LAMEIRÃO
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Examinador 03

Prof. Dr. RICARDO BEZERRA DE OLIVEIRA
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Orientador

Prof. Dr^a. ROSA HELENA VERAS MOURÃO
Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA
Co-orientadora

Santarém, janeiro, 2013

*Aos meus pais Francisco e Madalena Silva.
À minha irmã Mayara Silva.
E ao meu noivo Rodney Nogueira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, autor da vida, que nunca me desampara que me dá forças nas horas de desânimos, que me guia pelo melhor caminho e que me deu capacidade de concretizar este trabalho. Obrigada por tudo Senhor!

Agradeço ao **Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira** que foi meu orientador de iniciação científica na graduação e que aceitou esse segundo desafio de me orientar durante o Mestrado. Muito obrigada pela confiança, pelo conhecimento transferido, dedicação, paciência, correções, empenho e estímulo.

À **Prof^a. Dr^a. Rosa Helena Veras Mourão** co-orientadora deste trabalho, que com sua cordial atenção sempre esteve disposta a nos auxiliar durante as etapas desta pesquisa.

Aos meus pais **Francisco e Madalena Silva**, por todo amor e carinho que me dedicam, e pelo apoio e incentivo em todas as minhas escolhas e conquistas.

À minha irmã **Mayara Silva**, por sempre estar presente e disposta a me ajudar e pela constante torcida para que eu alcance meus objetivos. Ah, não podendo esquecer que foi juntamente com meu pai, companheira de coleta das flores de jambú na comunidade do Diamantino.

À meu noivo **Rodney Nogueira** por todo amor, incentivo, compreensão e carinho durante a última etapa da realização deste trabalho.

À **Adrielle Serra e Aline Evangelista** que participaram e me auxiliaram durante toda essa pesquisa, desde os trabalhos no biotério de manutenção e aquisição de animais até a realização dos testes de atividade biológica. Meninas, vocês foram fundamentais neste trabalho. Muito obrigada pelo companheirismo e amizade. Vocês são minhas “autarquias”!

A todos os membros do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental – LabBBEx pela colaboração, compreensão e companhia. Em especial à **Sandra Sarranzin** que sempre que necessário me ajudou na parte laboratorial do trabalho. À **Juliana Raposo** que me auxiliou na produção do extrato aquoso e na utilização do liofilizador. Aos alunos de iniciação científica **Santana Castro e Wagner Aguiar** pelo auxílio no teste de cromatografia em camada delgada e a toda equipe do Biotério que me ajudou na manutenção dos animais para a realização dos experimentos.

Aos professores e colegas de turma do PGRNA 2011. Destacando aqui minha equipe de trabalho durante o período de disciplinas: **Alírio Tenório, Jackeline Braga, Jéssica Ariana, Juceli Faustino e Patrícia Lopes**, pessoas por quem tenho grande admiração e amizade.

Ao Herbário da Embrapa Amazônia Oriental/Belém pela identificação botânica da espécie alvo deste estudo.

Aos órgãos financiadores, **CAPES, CNPq, FAPESPA, FAPESP** e à Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica – **PROPPIT** da UFOPA, pelo auxílio financeiro.

A todos os animais utilizados que foram essenciais para a realização deste trabalho. Dedico todo meu respeito e agradecimento.

Enfim, a todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para a realização deste trabalho, o meu **MUITO OBRIGADA!!!!!!!**

Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito debaixo do céu. (Eclesiastes 3.1)

RESUMO

Os vegetais têm sido uma rica fonte para obtenção de moléculas para serem exploradas terapeuticamente. O uso empírico de drogas de origem vegetal é registrado desde as civilizações mais antigas, sendo considerada uma das práticas mais remotas utilizada pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças. *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, conhecida popularmente no Brasil como jambú é uma hortaliça da família Asteraceae, bastante apreciada na região norte do Brasil, onde faz parte de pratos da culinária local e da medicina popular. Apesar de existirem indicações populares de *Acmella oleracea* para o tratamento de determinadas patologias, estudos toxicológicos do extrato da flor desta espécie não são descritos na literatura científica. Assim, o objetivo deste trabalho é analisar os efeitos do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* nas doses de 50, 100 e 200mg/kg, sobre a memória, locomoção, coordenação motora e ansiedade, através dos testes do labirinto aquático de Morris, campo aberto, labirinto em Y, teste do rota-rod e teste caixa claro-escuro, além de avaliar sua atividade antinociceptiva e antiinflamatória empregando os testes de retirada da cauda (tail-flick) e edema de pata induzido por carragenina 1%, no sentido de contribuir com uma melhor avaliação dos benefícios e danos causados pelo uso desta planta. O uso sub-crônico do extrato aquoso das flores dessa espécie nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, não demonstrou efeitos tóxicos sobre memória e coordenação motora dos animais, porém, causou um efeito ansiogênico nos animais no teste de locomoção em campo aberto. Nos testes farmacológicos, o extrato apresentou efeito antiedematogênico e antinociceptivo, resultados que corroboram com a literatura. A partir dos resultados obtidos, sugere-se que mais estudos que avaliem a atividade toxicológica da *Acmella oleracea* são necessários, uma vez que esta espécie constitui uma alternativa para tratamentos de processos inflamatórios e analgésicos. Contudo mais testes são necessários para elucidar os prováveis mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiinflamatória e antinociceptiva, bem como avaliar possíveis efeitos tóxicos.

Palavras-Chave: *Acmella oleracea*, testes comportamentais, atividades antiedematogênica e antinociceptiva.

ABSTRACT

Vegetables have been a rich source of getting molecules to be exploited therapeutically. The empirical use of drugs of plant origin is recorded since the earliest civilizations, and is considered one of the most remote practices used by men to cure, prevent and treat diseases. *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, popularly known as Jambu is a vegetable of the family Asteraceae, much appreciated in northern Brazil, where part of local cuisine and folk medicine. Although there are indications *Acmella oleracea* popular for the treatment of certain pathologies, toxicological studies of the extract of the flower of this kind are not described in the literature. Thus, the goal of this paper is to analyze the effects of aqueous extract of flowers *Acmella oleracea* at doses of 50, 100 and 200mg/kg, about memory, locomotion, motor coordination and anxiety by means of tests of the Morris water maze, field open in Y maze, rota-rod test and test box light / dark, and evaluating its anti-inflammatory and antinociceptive activity tests employing the withdrawal of the tail (tail-flick) and paw edema induced by 1% carrageenan in to contribute to a better assessment of benefits and damages caused by the use of this plant. The use of sub-chronic aqueous extract of flowers of this species at doses of 50, 100 and 200 mg / kg, showed no toxic effects on memory and motor coordination of the animals, but caused an anxiogenic effect in animals in the test of locomotion open field. In pharmacological tests, the extract showed antinociceptive effect antiedematogenic and these results corroborate with the literature. From the results, it is suggested that further studies to evaluate the toxicological activity of *Acmella oleracea* are required, since this species is an alternative for treatment of inflammatory and analgesics. But more tests are needed to elucidate the possible mechanisms of action involved in the activities and antiedematogenic antinociceptive and evaluate possible toxic effects.

Keywords: *Acmella oleracea*, behavioral tests, and antinociceptive activities antiedematogenic.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS	XII
LISTA DE FIGURAS	XIII
LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS	XIV
1 INTRODUÇÃO	16
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
1.1.1 PLANTAS MEDICINAIS	17
1.1.2 <i>ACMELLA OLERACEA (L.) R.K. JANSEN</i>	18
1.1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO	21
1.1.3.1 A FORMAÇÃO DO EDEMA	22
1.1.3.2 EVENTOS CELULARES E O PAPEL DOS LEUCÓCITOS	23
1.1.3.3 MEDIADORES QUÍMICOS NA INFLAMAÇÃO AGUDA.....	24
1.1.4 O PROCESSO NOCICEPTIVO	26
1.1.5 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	28
1.1.6 NEUROTOXICIDADE – MEMÓRIA, APRENDIZADO, LOCOMOÇÃO E COORDENAÇÃO MOTORA	29
2 OBJETIVOS	35
2.1 OBJETIVO GERAL:	35
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	35
3 BIBLIOGRAFIA	36
4 CAPÍTULO I (ARTIGO).....	41
RESUMO	43

ABSTRACT	43
INTRODUÇÃO	44
MATERIAL E MÉTODOS	45
MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO	45
CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	46
ANIMAIS.....	46
TESTES NEUROTÓXICOS (COMPORTAMENTAIS)	47
LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (MORRIS, 1984)	47
CAIXA CLARO/ESCURO (LIGHT/DARK BOX) (DENOBLE ET AL. 1986).....	48
LABIRINTO EM Y (SARTER ET AL., 1988)	49
AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA (TESTE DA BARRA GIRATÓRIA)	50
CAMPO ABERTO – BROADHURST, (1960)	50
TESTES FARMACOLÓGICOS	51
TESTE DA LATÊNCIA PARA O REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK) (D´AMOUR E SMITH, 1941).....	51
EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA 1% - WINTER ET AL. (1962)	52
ANÁLISE ESTATÍSTICA	53
RESULTADOS	53
EFEITOS TOXICOLÓGICOS.....	53
EFEITOS FARMACOLÓGICOS	55
DISCUSSÃO	55
CONCLUSÕES	61

AGRADECIMENTOS	61
BIBLIOGRAFIA CITADA	62
5 SÍNTESE INTEGRADORA	75
ANEXOS	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo I (Artigo)

Tabela 1	Condições cromatográficas utilizadas para caracterização fitoquímica do extrato aquoso das flores <i>A. oleracea</i>	66
Tabela 2	Triagem fitoquímica do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i>	67

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Figura 1	<i>Acmella oleracea</i> (L.) R.K. Jansen	19
Figura 2	Estrutura do espilantol (MOLINATORRES et al., 1996.....	20
Figura 3	Pletismômetro digital	26
Figura 4	Analgesímetro digital	28
Figura 5	Labirinto aquático	31
Figura 6	Caixa claro/escuro	32
Figura 7	Labirinto em Y	32
Figura 8	Barra giratória (rota-rod)	33
Figura 9	Campo aberto	34

CAPÍTULO I

Figura 1	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Labirinto Aquático de Morris	68
Figura 2	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) na Caixa claro-escuro.....	69
Figura 3	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Labirinto em Y.....	70

Figura 4	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Rota-rod.....	71
Figura 5	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50, 100 e 200 mg/kg no Campo aberto sobre QQPC (A), QQPP (B), QTQP (C), QL (D), QAL (E) e QBF (F).....	72
Figura 6	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50, 100 e 200 mg/kg nos diferentes tempos de retirada da cauda de ratos após estímulo da resistência térmica, no teste de retirada da cauda “tail flick”	73
Figura 7	Efeito da administração do extrato aquoso das flores de <i>A. oleracea</i> 50, 100 e 200 mg/kg na variação do edema de pata induzido por carragenina 1%	74

LISTA DE ABREVIACÕES, SIGLAS E SÍMBOLOS

CCA = Cromatografia em camada delgada

CCE = Caixa claro/escuro

EAFaO= Extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

mA= Miliamperes

oleracea= *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen

OMS= Organização mundial de Saúde

p/v= Peso/volume

QQPC= Quantidade de quadrantes percorridos no centro

QQPP= Quantidade de quadrantes percorridos na periferia

QTQP= Quantidade de quadrantes totais percorridos

QL= Quantidade de levantamentos

QAL= Quantidade de auto-limpeza

QBF= Quantidade de bolos fecais

r.p.m.= Rotações por minuto

SNC= Sistema nervoso central

TCA= Teste do campo aberto

TCCE= Teste caixa claro/escuro

v.o= Via oral

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido utilizadas pelo homem no intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais contra um grande número de doenças causadas por diferentes agentes patológicos (KHAN, 2006). A preferência na utilização das plantas medicinais vem da facilidade de obtenção e do baixo custo. Todavia, as plantas medicinais possuem ampla diversidade de metabólitos secundários com as mais diferentes atividades biológicas que são alvo de estudos pela sua importância terapêutica ou por sua toxicidade (SIMÕES *et al.*, 2010).

No Brasil, país privilegiado que ocupa o primeiro lugar dentre os 17 países mais ricos do mundo em biodiversidade, e detentor de aproximadamente 23% do total de espécies existentes no planeta (RATES, 2001), diversas plantas da flora nativa são amplamente utilizadas na forma de extratos, infusões ou emplastos sem a devida comprovação de suas propriedades farmacológicas, caracterizando um sério problema de saúde pública, pois assim como os medicamentos convencionais, as plantas medicinais também apresentam toxicidade (HOLETZ *et al.*, 2002).

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen, espécie conhecida popularmente como jambú, é uma representante da família Asteraceae, típica do clima tropical que desenvolve-se bem em clima quente e úmido. Destaca-se na região norte do Brasil por apresentar inúmeras aplicações tanto na culinária quanto na medicina popular.

Diversos trabalhos têm demonstrado as atividades farmacológicas presentes em representantes desta família (BAE *et al.*, 2010a; BOONEN *et al.*, 2010b), porém estudos que investiguem seus efeitos tóxicos não são encontrados na literatura, principalmente pesquisas relacionadas à espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, altamente utilizada na região norte do Brasil. Justifica-se assim, a relevância de nossos estudos, afim de avaliar as atividades farmacológicas e toxicológicas das flores desta espécie para que haja confirmação de suas indicações de uso na medicina popular e segurança na sua utilização, uma vez que a avaliação da ação tóxica de extratos de plantas é indispensável para considerar um tratamento seguro.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde o início da civilização, o homem faz uso das plantas para os mais diversos fins, levando-o à descoberta de possíveis aplicações terapêuticas de determinadas espécie e sua aplicação na prevenção, tratamento e cura de diversas doenças (BHANDARE *et al.*, 2010).

Os produtos naturais têm exercido importante papel na medicina popular e também na medicina moderna, sendo matéria prima de compostos com importantes atividades biológicas. Apesar do grande avanço da medicina nos últimos séculos, ainda existem obstáculos na sua utilização por populações carentes que enfrentam a falta de acesso ao atendimento hospitalar, exames e aos medicamentos industrializados. Tais motivos, associados com a fácil obtenção e grande tradição no uso de plantas medicinais contribuem para o crescimento da fitoterapia no tratamento de doenças (EVANS *et al.*, 2002). A fitoterapia é um método de tratamento que utiliza vegetais frescos, drogas vegetais ou, ainda, extratos vegetais preparados com esses dois tipos de matérias-primas. Etimologicamente, fitoterapia significa tratamento por meio de plantas, sendo considerado fitoterápico, todo medicamento obtido e elaborado empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais ativas com finalidade curativa ou profilática com benefício para o usuário (OLIVEIRA, 2009).

A maior fonte de substâncias bioativas, sintetizado pelas plantas, são os seus metabólitos secundários. Por muito tempo estes foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Atualmente, entretanto sabe-se que os metabólitos secundários além de serem substâncias diretamente envolvidas na adequação do vegetal a seu meio, também apresentam atividades biológicas interessantes. Assim, as plantas são fontes importantes de compostos bioativos naturais, que freqüentemente se constituíram em modelos para síntese de grande número de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2010).

A partir da segunda guerra mundial, houve um grande avanço na indústria química que aperfeiçoou processos de produção sintética de diversos princípios ativos, que anteriormente eram encontrados apenas nos vegetais, o que ocasionou uma grande redução no consumo de produtos de origem natural. Por outro lado, os efeitos colaterais

decorrentes do uso de medicamentos obtidos por síntese eram cada vez mais frequentes, fazendo com que a população passasse a redescobrir e utilizar as plantas medicinais para solução de seus problemas de saúde. Por serem produtos de fácil acesso e custo acessível seu consumo passou a intensificar-se (CALIXTO, 2000).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso (BRASIL, 2006_b). Como forma de fortalecer e regularizar o uso de fitoterápicos, o Sistema Único de Saúde após a década de 80, lançou diversos instrumentos normativos como a Portaria nº 212, de 11 de setembro de 1981 que define o estudo das plantas medicinais como uma das prioridades de investigação clínica, a implantação do Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos do Ministério da Saúde (PPPM/Ceme), que, em 1982, objetivou o desenvolvimento de uma terapêutica alternativa e complementar, com embasamento científico, pelo estabelecimento de medicamentos fitoterápicos, com base no real valor farmacológico de preparações de uso popular, à base de plantas medicinais, entre outros (BRASIL, 2006_a). Mesmo assim, ainda há necessidade de um maior número de pesquisas que envolvam plantas medicinais, possibilitando, o descobrimento de substâncias farmacologicamente ativas e o desenvolvimento de medicamentos acessíveis.

Dentre as várias espécies vegetais utilizadas com fins fitoterápicos, encontram-se as espécies da família Asteraceae que se destaca por ser uma família altamente diversificada, onde a espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen possui inúmeras aplicações na área da medicina popular na Amazônia e suas atividades farmacológicas têm sido alvo de estudos (NASCIMENTO *et al.*, 2012; SIMAS *et al.*, 2013).

1.1.2 *ACMELLA OLERACEA* (L.) R.K. JANSEN

A espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen (Figura 1) é uma planta da família Asteraceae que compreende cerca de 1.535 gêneros com aproximadamente 23.000 espécies, sendo a segunda maior família da Angiospermae (BREMER, 1994), encontra-se amplamente distribuída nos trópicos e sub-trópicos, especialmente na Índia, Venezuela, África, Indonésia, Malásia e Brasil (ONG *et al.*, 2011). No Brasil, é

conhecida popularmente como jambu, jambuaçu, agrião-do-pará, agrião bravo, agrião do Norte, botão de ouro, erva maluca, planta da dor de dente, entre outros (POLTRONIERI *et al.*, 2000). As sinónimas de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen são: *Spilanthes oleracea* L., *Cotula pyretharia* L., *Pyrethrum spilanthus* Medik., *Spilanthes acmella* var *oleracea* (L.), *Spilanthes fusca* MART (LORENZI e MATOS, 2002), *Bidens fervida* Lan, *Bidens fusca* Lan, *Isocarpa pyretharia* (L.) Cass, *Spilanthes radicans* Schrad. Ex D. C., *Spilanthes oleracea* b *fusca* (Lam.) D. C. (HIND e BIGGS, 2003).



Figura 1 – *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen. Foto: Marcia Silva.

Acmella oleracea (L.) R.K. Jansen, caracteriza-se por ser uma planta herbácea, de 30 a 60 cm de altura, semi-ereta ou quase rasteira, com caule cilíndrico, carnoso e de ramos decumbentes (FAVORETO e GILBERT, 2010). Possui raiz principal pivotante, com abundantes ramificações laterais e raízes adventícias no caule e nos ramos que estão em contato com o solo (CARDOSO, 1997). Suas folhas são simples, com lâmina amplamente ovada, apresentando pêlos esparsos em ambas as superfícies (HIND e BIGGS, 2003). As flores são pequenas e amareladas, dispostas em capítulos globosos que medem cerca de 1 cm de diâmetro. As sementes encontram-se localizadas na

inflorescência sendo pequenas achatadas e acinzentadas, sua propagação pode ser por semente ou estaquia (CAVALCANTI, 2008; RATNASOORIYA, 2004).

O jambú é bastante apreciado na região norte do Brasil, onde faz parte de pratos da culinária local e amplamente consumido em festas populares, além de ser utilizado na medicina popular. Suas folhas e flores tem sido utilizadas na medicina tradicional na forma de infusão e macerados como diurético (RATNASOORIYA *et al.*, 2004), anti-inflamatório (GERTSCH, 2008), larvicida, inseticida (PANDEY *et al.*, 2007), anestésico local (CHAKRABORTY *et al.*, 2010), analgésico (RIOS *et al.*, 2007).

O espilantol, substância abundantemente encontrada na espécie *Acmella oleracea*, é uma amida alifática (N-isobutilamidas) de fórmula molecular $C_{14}H_{23}NO$, descrita como um óleo viscoso ardente, de coloração amarelo claro, que produz um efeito anestésico e de formigamento sobre a língua, daí sua utilização nas afecções da boca e garganta e como tratamento para dores de dentes (BOONEN 2010a). A sua composição química tem potencial para uso industrial, já existindo várias patentes para sua utilização como aditivo para alimentos e bebidas (HAUS SHOKUHIN KOGYO Co. Lt., 1970); agente de limpeza em preparações para o corpo e cabelos (TAKASAGO PERFUMERY Co. Lt., 1992); uso como produto inseticida, para o controle de insetos e microorganismos em plantas (NATURAL PROD. KK, 2002), sendo também citado como indicativo para diversas doenças (GUSMÃO *et al.*, 2005).

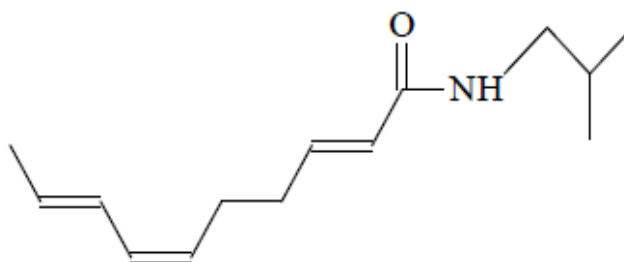


Figura 2 - Estrutura do espilantol (MOLINATORRES *et al.*, 1996).

Patentes sobre estudos com jambú são registrados desde os anos 70 e até o ano de 2006 foram realizados aproximadamente trinta e quatro pedidos de patentes, todos de outros países como Estados Unidos, Inglaterra e Japão.

Dentre as atividades já descritas para *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, destacam-se as atividades antiinflamatórias, onde a espécie tem sido utilizada de modo empírico no combate de infecções de garganta, gengiva, afecções gerais de boca, estomatite, hemorroidas, reumatismo e como tratamento para dores de dente (BAE *et al.*, 2010; BOONEN *et al.*, 2010b; SHARMA *et al.*, 2011). E uma vez que o processo inflamatório está envolvido em diversas patologias (COUTINHO *et al.*, 2009), é de grande importância compreender a evolução deste processo.

1.1.3 O PROCESSO INFLAMATÓRIO

A origem da palavra inflamação vem do grego “phlogosis” e do latim “flamma”, que significa fogo, área em chamas e foi descrita pela primeira vez por Celsus, um escritor romano que viveu entre os anos 30 aC e 38 dC, onde observou os quatro sinais cardinais da inflamação: calor (aumento da temperatura local), rubor (hiperemia), tumor (edema) e dor, as quais Virchow acrescentou o quinto sinal clínico, a perda da função (functio laesa) (ROCHA e GARCIA, 2006).

O processo inflamatório é um conjunto coordenado de eventos que permitem que os tecidos respondam contra agentes nocivos de origem endógena ou exógena, com o objetivo destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo que podem ser estímulos agressores de origem química, física ou biológica (TALWAR *et al.*, 2011).

A inflamação é caracterizada pelo extravasamento de proteínas séricas e líquidos, e migração de leucócitos para o meio extravascular. Este movimento é coordenado por diversos mediadores químicos como aminas vasoativas, eicosanóides e citocinas que contribuirão para o surgimento dos sinais cardinais da inflamação que são rubor, calor, edema, dor e perda da função (ARAWWAWALA *et al.*, 2010). O surgimento destes sinais é ocasionado pela vasodilatação local que aumenta o fluxo sanguíneo na área inflamada (rubor e calor). O edema surge principalmente pela fase exsudativa e produtiva-reparativa, onde ocorre o aumento de líquido e de células (SERHAN *et al.*, 2008). A dor é originada de mecanismos mais complexos que incluem

compressão das fibras nervosas locais devido ao acúmulo de líquidos e de células e agressão direta às fibras nervosas. Já a perda de função, é decorrente do tumor (edema) e da própria dor (LAWRENCE *et al.*, 2002). O processo de tentativa de cura e reparo da região lesada começa nas primeiras fases da inflamação onde o tecido afetado é substituído por células parenquimatosas nativas regeneradas, pelo preenchimento com tecido fibroso (cicatrização), ou pela combinação dos dois processos, que geralmente é finalizado depois da neutralização da influência nociva (KUMAR *et al.*, 2008). Embora o processo inflamatório tenha por finalidade a eliminação do agente agressor e reparação (cicatrização e regeneração) do tecido afetado, ele também pode apresentar-se altamente danoso, causando danos irreversíveis ao organismo (KANTERMAN *et al.*, 2012).

A inflamação de acordo com sua severidade e duração determina diferentes graus ou fases de transformação nos tecidos. Categoricamente, a resposta inflamatória é dividida em três distintas fases. Inicialmente é evidenciada uma fase aguda, com duração relativamente variável (horas a dias), apresentando eventos vasculares com exsudação plasmática e migração de neutrófilos para o sítio lesado, seguida de uma fase subaguda, em que nota-se, predominantemente, a infiltração leucocitária e de outras células fagocíticas e posteriormente, ocorre à fase crônica, onde a proliferação é fato de destaque, em que ocorre a regeneração tecidual e fibrose (MONTENEGRO e FRANCO, 2008).

1.1.3.1 A FORMAÇÃO DO EDEMA

O endotélio vascular forma a interface entre o sangue e os tecidos, controlando o extravasamento de solutos, macromoléculas e células brancas do plasma entre os dois ambientes. Além de possuir grande importância na manutenção da função normal vascular secretando fatores anticoagulantes, respondendo e participando do processo inflamatório, prevenindo a perda de volume do sangue e regulando o tônus vascular (SURAPISITCHAT *et al.*, 2007).

O endotélio é caracterizado por ser uma barreira dinâmica e altamente suscetível a diversos estímulos fisiopatológicos. As alterações nos vasos sanguíneos iniciam-se rapidamente após a infecção ou lesão. Após uma vasoconstrição transitória ocorre

vasodilatação das arteríolas, resultando no aumento do fluxo sanguíneo (rubor e calor) e abertura dos leitos capilares (BOUEIZ e HASSOUN, 2009).

Com a microcirculação mais permeável, ocorre um extravasamento de líquido rico em proteínas para dentro de tecidos extra vasculares, o que diminui a velocidade da circulação visto que o sangue estará mais viscoso pela maior concentração das hemáceas. A perda de proteína do plasma reduz a pressão osmótica intravascular e eleva a pressão osmótica do líquido intersticial, resultando no fluxo de água e íons para os tecidos extra vasculares (MONTENEGRO e FRANCO, 2008). Assim, o edema, uma característica do processo inflamatório, é causado pelo aumento da permeabilidade vascular, que leva ao extravasamento transvascular de flúido rico em proteínas de alto peso molecular (exsudato) do compartimento intravascular para o interstício (ALLER *et al.*, 2006).

1.1.3.2 EVENTOS CELULARES E O PAPEL DOS LEUCÓCITOS

Uma importante função do processo inflamatório é o recrutamento de leucócitos circulantes no sangue para o local da lesão e sua ativação. Estão presentes em grande quantidade na medula óssea e estas células podem ser rapidamente mobilizadas durante processos infecciosos e inflamatórios (FURZE e RANKIN, 2008).

A saída dos leucócitos dos vasos ocorre em estágios: (1) marginação, aderência ao endotélio e rolagem ao longo da parede do vaso; (2) aderência firme ao endotélio; (3) transmigração entre as células endoteliais - diapedese e (4) migração para os tecidos intersticiais (KUMMAR *et al.*, 2008). É graças à diapedese, fenômeno de passagem das células do sistema imune presentes nos vasos para os tecidos, que os agentes causadores da lesão são encontrados. Os leucócitos se locomovem ao longo de um gradiente químico, atravessam a membrana basal e passam para o espaço extravascular em direção ao local da lesão (processo de quimiotaxia). No local da lesão, os neutrófilos e macrófagos reconhecem o agente agressor, englobam e o destroem (SERHAN *et al.*, 2008).

Os leucócitos também são capazes de produzir no meio extracelular, fibras sensíveis constituídas de proteínas que participaram do controle de infecções e como barreira física impedindo o alastramento das bactérias, além de outras proteínas, que

possuem função de destruir bactérias e degradar seus fatores de virulência antes mesmo de serem fagocitadas pelas células de defesa. A desvantagem do potencial defensivo dos leucócitos é que, uma vez ativados, podem induzir lesão tecidual e prolongar a inflamação, já que os produtos dos leucócitos que destroem micróbios podem também lesar os tecidos normais do hospedeiro (BRINKMANN *et al.*, 2004).

1.1.3.3 MEDIADORES QUÍMICOS NA INFLAMAÇÃO AGUDA

O processo inflamatório é mediado por inúmeras substâncias de origem celular ou sanguínea. Muitos mediadores estimulam a liberação de outros, exercendo uma ação sinérgica. (ROTELLI *et al.*, 2003). No local da inflamação, macrófagos, mastócitos, células endoteliais e leucócitos recrutados do sangue são capazes de produzir diferentes mediadores da inflamação (ALLER *et al.*, 2007). A histamina e serotonina são armazenadas nos mastócitos e caracterizam-se por serem um dos primeiros mediadores liberados. A histamina causa dilatação das arteríolas, aumento da permeabilidade vascular e contração venular e é liberada pelos mastócitos. A serotonina possui efeitos semelhantes a histamina, sendo encontrada nas plaquetas e liberada durante a agregação plaquetária (ALLER *et al.*, 2006).

A ação de mediadores químicos, tais como os produtos derivados do metabolismo do ácido araquidônico (prostaglandinas e leucotrienos), aminoácidos ou seus derivados (glutamato, noradrenalina, serotonina e dopamina), peptídeos (cininas, taucicinas, galanina, colecistocinina), proteínas (citocinas), entre outros, são responsáveis por praticamente cada etapa da inflamação e pela multiplicidade de eventos que ocorrem durante a transmissão dolorosa, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (CALIXTO *et al.*, 2000).

No processo inflamatório a atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias algôgenas liberadas e/ou sintetizadas em elevada concentração, no ambiente tecidual. Substâncias endógenas, como prostaglandinas, neuropeptídeos, cininas, aminoácidos excitatórios, entre outros, são produzidas e liberadas pelo tecido lesionado e estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios. Além disso, os mediadores inflamatórios liberados facilitam a neurotransmissão e sensibilizam o nociceptor (BJÖRKMAN, 1995).

Muitas espécies de plantas possuem substâncias que atuam no processo inflamatório, assim como as representantes da família Asteraceae. Embora existam estudos com diversos gêneros dessa família, testando suas atividades antinociceptiva, anti-diurética, anti-inflamatória, anti-larvívora entre outros (ONG *et al.*, 2011). Entretanto não há na literatura trabalhos que evidenciem seus possíveis efeitos tóxicos para os que a utilizam com fins terapêuticos. Considerando este fato, realizaremos no presente estudo, testes para avaliarmos a atividade neurotóxica de *Acmella oleracea* e testes de inflamação e analgesia para corroborar pesquisas já realizadas, verificando assim, as atividades presentes no jambú consumido na região amazônica, já que existe uma grande variedade de gêneros desta espécie espalhadas nas regiões tropicais.

Modelos experimentais como edema de pata induzido por agente flogístico são testes amplamente utilizados para testar a atividade antiinflamatória de substâncias em pesquisa. Os modelos experimentais de inflamação são ferramentas de fácil execução e os resultados permitem inferir sobre a etapa do processo inflamatório que o agente testado pode interferir.

O teste de edema de pata baseia-se na variação do volume das patas traseiras dos animais, que será medido através do pletismômetro digital (Figura 3), após a aplicação de um estímulo inflamatório. O edema formado é agudo e progressivo e seu desenvolvimento depende do agente flogístico utilizado. O edema produzido pela carragenina é bifásico, associado com a produção de vários mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, óxido nítrico e citocinas (ALLER *et al.*, 2007). Na fase inicial, até 1,5 h, histamina e serotonina são liberadas seguido de cininas, como a bradicinina, e o fator de ativação plaquetária (PAF), e na fase final (3-4 h) da inflamação são liberadas prostaglandinas e outros autácóides que são responsáveis pela formação do exsudato inflamatório (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).



Figura 3 – Pletismômetro digital. Foto: Adrielle Serra.

1.1.4 O PROCESSO NOCICEPTIVO

Desde a antiguidade, o homem vem buscando formas de aliviar a dor. Estudos relatam que as primeiras tentativas de controlar a dor utilizavam rituais, nos quais acrescentavam o uso de plantas com prováveis efeitos farmacológicos (MOOREA, 2009). A dor foi definida em 1900 por Sherrington, um dos primeiros neurocientistas, como um auxílio psíquico a um reflexo imperativo de proteção. Esta definição refletia uma dimensão primitiva da dor, onde a resposta motora era orientada para remover o tecido de insultos potencialmente prejudiciais (LAMONT *et al.*, 2000). De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (em inglês, IASP), a dor é definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial.

Atualmente a dor é reconhecida como uma das principais consequências relacionadas com as mais diversas patologias e suas repercussões são consideradas potencialmente prejudiciais para o organismo, portanto é um sintoma de alto custo em termos de sobrecarga humana e financeira (WILHELM *et al.*, 2009). Do ponto de vista biológico, é possível que se caracterize a dor em duas modalidades básicas: aguda e crônica. A dor aguda se manifesta transitoriamente por um período curto e na maioria

das vezes com causas facilmente identificáveis. Funciona como um alerta do corpo para lesões em tecidos, inflamações ou doenças, centralizada primeiro e depois capaz de se tornar difusa. Clinicamente, uma dor crônica é aquela que excede seis meses, sendo constante e intermitente e quase sempre está associada a um processo de doença crônica (MOOREA, 2009).

A nociceção envolve a ativação sensorial de neurônios que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal, de onde é transmitido para o supra espinhal. Através do dano tecidual pode ocorrer ativação de nociceptores através da liberação de vários mediadores, incluindo aminoácidos excitatórios, peptídeos, lipídios e citocinas, que se ligam aos receptores e ativam as vias de sinalização (WILHELM *et al.*, 2009). Os nociceptores são terminações nervosas livres, não-especializadas, que respondem a estímulos nociceptivos e são amplamente encontrados na pele, mucosas, membranas, fâscias profundas, tecido conjuntivo de órgãos viscerais, ligamentos e cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões e vasos arteriais; cujos campos de recepção podem ir desde de pequenas regiões puntiformes até áreas que medem vários milímetros de diâmetro (ALMEIDA *et al.*, 2004).

Assim, o potencial antinociceptivo de um composto pode ser medido pelo seu poder de aumentar o limiar de excitação dessas terminações nervosas ao estímulo doloroso, ou então, fazer com que os nociceptores não percebam ou não respondam ao estímulo doloroso. Pesquisas etnofarmacológicas tradicionais no uso de plantas para o alívio da dor são vistas como estratégia produtiva e lógica na procura por novas drogas analgésicas (ISHOLA *et al.*, 2011).

Existem atualmente vários modelos experimentais usados para testar a atividade antinociceptiva de uma substância, embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente na ocorrência da dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas na presença de drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que nos permite inferir que um animal de experimentação está experimentando uma resposta algica (PERAZA *et al.*, 2007).

O teste de tail-flick é realizado utilizando-se um analgesímetro digital (Figura 4), no qual ocorre a aplicação de radiação térmica através de um filamento que é aquecido,

gradativamente até 70°C durante 12 s, a partir do contato com uma pequena superfície da cauda do animal (HARDY *et al.*, 1957). A retirada da cauda é provocada por este estímulo térmico, através de um reflexo de origem espinhal. Existindo um aumento de tempo na retirada da cauda do animal, este é interpretado com uma ação antinociceptiva. Assim a atividade antinociceptiva é determinada tomando-se como base o aumento da temperatura para retirada da cauda dos animais tratados em relação às mesmas respostas dos animais do grupo controle (RAFFA *et al.*, 1992).



Figura 4 – Analgesímetro digital. Foto: Marcia Silva.

1.1.5 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

O aumento do uso das plantas medicinais foi fortemente influenciado pelo surgimento do conceito de “natural”. Conceito que muitas vezes é visto como ausência de produtos químicos que possam causar danos ou representar perigo, o que não está correto, uma vez que as plantas tem sido fornecedoras de produtos altamente tóxicas ao longo da história (MENGUE *et al.*, 2001). Os gregos utilizavam determinadas plantas como veneno para execução de condenados a morte, como no caso do Filósofo Grego Sócrates que foi executado com a ingestão do extrato de cicuta (*ConiumMaculatum*) que é altamente neurotóxico (CROTEAU *et al.*, 2000).

Estudos científicos tem comprovado a toxicidade de inúmeras plantas antes utilizadas naturalmente sem restrições e de forma indiscriminada. Na França, o uso de

cápsulas de têucrio (*Teucriumchamaedrys L. – Labiateae*) causou uma epidemia de hepatite, essa espécie de planta era tida como segura até que a comercialização do vegetal em cápsulas associado à camomila desencadeou os casos de hepatotoxicidade. No Brasil, na década de 80, o confrei (*Symphytumofficinale L. Boraginaceae*) foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer. Estudos posteriores demonstraram o risco do uso interno desta planta, altamente hepatotóxica devido a alcaloides pirrolizidínicos (STICKEL e SEITZ, 2000).

As plantas, assim como os demais seres vivos, produzem substâncias químicas que podem atuar tanto de forma benéfica como tóxica ao serem utilizadas. Desta forma, para que se possa fazer uso medicinal de uma espécie, é fundamental que tenha sido realizado primeiramente estudos químicos, farmacológicos e toxicológicos minuciosos (RITTER *et al.*, 2002).

1.1.6 NEUROTOXICIDADE – MEMÓRIA, APRENDIZADO, LOCOMOÇÃO E COORDENAÇÃO MOTORA

A neurotoxicidade tem sido definida como um amplo conceito incluindo os efeitos adversos sobre a estrutura e função do sistema nervoso central ou periférico, causado por agentes biológicos, químicos ou físicos (SLIKKER JR e BOWYER, 2005).

O sistema nervoso é considerado complexo por conter uma série de mecanismos pelos quais potenciais agentes desencadeadores de quadros de toxicidade podem produzir lesões (SLIKKER JR e BOWYER, 2005). As microglias, células responsáveis pela imunidade inata do cérebro, são consideradas altamente importantes no processo de inflamação mediado por neurotoxicidade, já que entre suas funções está a destruição de patógenos (ZHENG *et al.*, 2008). Uma das áreas mais afetadas no sistema nervoso por substâncias tóxicas é o sistema límbico, onde encontra-se o hipocampo, região envolvida no processo de memória e aprendizado (PREDIGER, 2008), além de desempenhar um importante papel no processamento de informações e no comportamento animal. A região dorsal do hipocampo tem função no processo de aprendizagem espacial e memória, e a região ventral tem papel principal no comportamento relacionado à ansiedade (BANNERMAN *et al.*, 2004).

Aprendizado e memória são funções básicas do sistema nervoso central (SNC), fundamentais para adaptação de um organismo ao meio ambiente (IZQUERDO, 2002). A aprendizagem é a mudança de comportamento viabilizada pela plasticidade dos processos neurais cognitivos. A aprendizagem resulta da recepção e da troca de informações entre o meio ambiente e os diferentes centros nervosos. Ou seja, a aprendizagem inicia com um estímulo de natureza físico-química advindo do ambiente que é transformado em impulso nervoso pelos órgãos sensoriais (ROMANELLI, 2003).

Pesquisas envolvendo o comportamento animal têm demonstrado que os organismos são capazes de adquirir informações acerca de aspectos do ambiente e também de seus próprios atos, de forma a registrar e conservar de modo codificado, em seu sistema nervoso central (SNC), eventos relevantes. Esse registro ou a informação codificada seria a representação da realidade externa no SNC tornando o animal capaz de prever eventos e de preparar-se para ação. Todo este processo de formação do mapa cognitivo está relacionado ao hipocampo, que permite aos animais elaborarem suas memórias espaciais, orientando-se espacialmente nos ambientes (O'KEEFE, 1979).

Outra região geralmente afetada pela ação tóxica de substâncias é o cerebelo, área do SNC que por muito foi tradicionalmente vista como parte do cérebro com papel principal sobre o ajuste do movimento, equilíbrio e coordenação (CHEN *et al.*, 2007), mas que hoje graças aos avanços da neurociência, além de ser considerado como centro da coordenação motora no SNC, sabe-se que é uma região participante de uma gama muito maior de funções do que era convencionalmente aceito, incluindo as funções cognitivas, sensoriais e linguísticas entre outras (CHIZHIKOV e MILLEN, 2003; MURDOCH, 2010).

A avaliação da neurotoxicidade de uma substância pode ser realizada por meio de métodos comportamentais baseando-se na avaliação específica do **comportamento cognitivo**, como o aprendizado e os processos relacionados com memória; na análise da **função motora**, através do esforço e a resistência muscular, bem como alterações na marcha; e na avaliação da **função sensorial** que também é incluso no estudo de metodologias de análises comportamentais (HALLIER-VANUXEEM *et al.*, 2009; KULLIG *et al.*, 1996). Na utilização de animais para testes de toxicidade, os ratos são bastantes empregados, pois já são modelos consagrados e usados na avaliação de plantas medicinais e tóxicas (MELO *et al.*, 2008).

Nos testes toxicológicos, o modelo de aprendizagem e memória labirinto aquático de Morris (1981) vem se destacando entre os aparelhos desenvolvidos para avaliar a memória e aprendizado em modelos experimentais (Figura 5). Este teste baseia-se no fato de que roedores apresentam aversão à imersão em água (FIGUEIRAS e MANHÃES, 2004) e possuem a característica de serem nadadores natos (MORRIS, 1984; WHISHAW, 1995), procurando assim, sair da água o mais rápido possível, encontrando e memorizando o local onde se encontra a plataforma de escape.

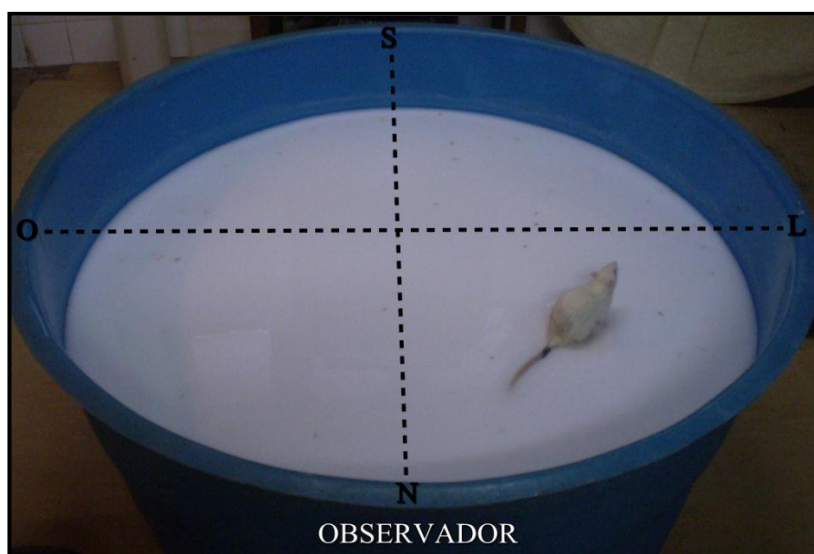


Figura 5 – Labirinto aquático. Foto: Ellen Aranha.

O teste da caixa claro/escuro (TCCE) baseia-se na aversão inata de roedores em áreas iluminado e sobre o comportamento exploratório espontâneo (CRAWLEY e GOODWIN, 1980). É composto de uma caixa experimental dividida em dois compartimentos, sendo um deles iluminado e outro não (Figura 6). Diante da aversão natural dos animais a ambientes iluminados, este modelo permite observar os níveis de ansiedade pela frequência no ambiente iluminado. A latência de saída do compartimento escuro também pode ser utilizada como índice de ansiedade. Além da ansiedade, este teste permite a avaliação da memória dos animais testados, quando aplicado um sistema de choque, onde os mesmos são condicionados a lembrar que o ambiente escuro não é seguro.



Figura 6 – Caixa claro/escuro. Foto: Marcia Silva.

Os modelos que testam a capacidade de memorização e locomoção como o Labirinto em Y, (Figura 7) são metodologias propostas inicialmente por Montgomery na década de 50. O labirinto em Y é baseado na tendência inata de roedores para exploração de novos ambientes, tornando-se uma ferramenta útil no estudo da memória em roedores (CHEN *et al.*, 2010).



Figura 7 – Labirinto em Y. Foto: Marcia Silva.

O teste da barra giratória (*rota-rod*) é um teste que permite avaliar a coordenação motora, o equilíbrio e a força muscular (PAZAIT et al., 2009). O equipamento consiste num cilindro com diâmetro de 3 cm, suspenso 20 cm da superfície do aparelho, movido por um motor que mantém a velocidade constante (Figura 8). Cada animal é colocado sobre a barra giratória, e o tempo de permanência até a queda é registrado em segundos.



Figura 8 – Barra giratória (*rota-rod*). Foto: Marcia Silva.

O teste do campo aberto (TCA) (Figura 9) é um modelo de locomoção e sedação podendo ser utilizado tanto para verificar os efeitos de substâncias sobre a memória espacial e/ou efeitos sedativos sobre o sistema motor dos animais. Substâncias estimulantes do SNC tendem a aumentar os parâmetros comportamentais registrados no modelo enquanto que substâncias depressoras tendem a diminuí-los. A tendência natural do animal em ambiente novo é a de explorá-lo, apesar do conflito com o medo provocado pela novidade (MONTGOMERY, 1958).



Figura 9 – Campo aberto. Foto: Marcia Silva.

Estudos toxicológicos têm sido amplamente utilizados para análise de possíveis efeitos tóxicos em plantas que possuam algum efeito medicinal, uma vez que o cuidado na utilização de plantas medicinais é de suma importância no controle de possíveis efeitos adversos e colaterais ao organismos, pois apesar de algumas espécies serem denominadas medicinais podem ser altamente tóxicas de acordo com sua utilização. Por isso, a toxicidade de plantas medicinais é hoje um problema, motivo de preocupação crescente nos meios científicos que envolvem fitoterapia, já que o desconhecimento por parte da população sobre efeitos secundários e toxicidade de espécies utilizadas habitualmente pode levar a consequências sérias. Assim, a investigação do potencial tóxico de plantas medicinais pode elucidar importantes aspectos farmacológicos de seus princípios naturais, permitindo uma utilização segura, conhecendo e respeitando seus possíveis riscos toxicológicos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

- Avaliar o os efeitos neurotóxicos do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, assim como seu potencial farmacológico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Determinar as principais classes de compostos presentes na espécie *Acmella oleracea* através do teste de cromatografia em camada delgada (CCA).
- Investigar os efeitos da administração crônica do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* sobre a aprendizagem e memória de ratos Wistar.
- Avaliar os efeitos da administração crônica do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* sobre a locomoção e coordenação motora de ratos Wistar.
- Investigar os efeitos ansiolíticos/ansiogênicos da administração crônica do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* em camundongos.
- Investigar os efeitos antinociceptivo e antiedematogênico do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea*.

3 BIBLIOGRAFIA

- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, p. 202 – 209, 2007.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. **Medical Science Monitor**, v. 12, n. 10, p. 225 – 234, 2006.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ARAWWAWALA, M.; THABREW, I.; ARAMBEWELA, L.; HANDUNNETTI, S. Anti-inflammatory activity of *Trichosanthes cucumerina* Linn. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 538–543, 2010.
- BAE, S. S.; EHRMANN, B. M.; ETTEFAGH, K. A.; CECH, N. B. A validated liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry method for quantification of spilanthol in *Spilanthes acmella* (L.) Murr. **Phytochemical analysis**, v. 21, n. 5, p. 438-43, 2010.
- BANNERMAN, D. M.; RAWLINS, J. N. P.; MCHUGH, S. B.; DEACON, R. M. J.; YEE, B. K.; BAST, T. ; ZHANG, W. N.; H.H.J. POTHUIZEN, H. H. J.; FELDON, J. Regional dissociations within the hippocampus memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 28, p. 273–283, 2004.
- BHANDARE, A. M.; KSHIRSAGAR, A. D.; VYAWAHARE, N. S.; HADAMBAR, A. A.; THORVE, V. S. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. **Food Chem. Toxicol.**, v. 48, p. 3412-3417, 2010.
- BJÖRKMANN, R. Central antinociceptive effects of non -steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 39, n. 103, p. 1-44, 1995.
- BOONEN, J.; BAERT, B.; BURVENICH, C.; BLONDEEL, P.; SAEGER, S.; SPIEGELEER, B. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bioactive spilanthol. **J Pharm Biomed Anal**, v. 53, n. 3, p. 243-9, 2010a.
- BOONEN, J.; BAERT, B.; ROCHE, N.; SPIEGELEER, B. Transdermal behaviour of the N-alkylamidespilanthol (affinin) from *Spilanthes acmella* (Compositae) extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 77–84, 2010b.
- BOUEIZ, A.; HASSOUN, P. M. Regulation of endothelial barrier function by reactive oxygen and nitrogen species. **Microvascular Research**, v. 77, n. 1, p. 26-34, 2009.
- BRASIL, **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no Sistema Único de Saúde**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, DF, 03 de maio de 2006_a.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006_b.
- BREMER, K. 1994. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland, Timber Press. 752p.
- BRINKMANN, V.; REICHARD, U.; GOOSMANN, C.; FAULER, B.; UHLEMANN, Y.; WEISS, D. S.; WEINRAUCH, Y.; ZYCHLINSKY, A. Neutrophil Extracellular Traps Kill Bacteria. **Science**, v. 303, p. 1532- 1535, 2004.

CALIXTO, J B; CABRINI, D A; FERREIRA, J; CAMPOS, M M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v.87, n. 1, p. 1-5, 2000.

CARDOSO, M. O. **Hortaliças não convencionais da Amazônia**. Brasília: Embrapa-SPI: Manaus: Embrapa-CPAA. 1997. 150p.

CAVALCANTI, V. M. S. **Extração de espilantol de *Spilanthesacmellavar oleracea* com dióxido de carbono supercrítico**. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual de Campinas, 2008.

CHAKRABORTY, A.; DEVI, B. R.; SANJEBAM, R.; KHUMBONG, S.; THOKCHOM, I. S. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *SpilanthesacmellaMurr*. In experimental animal models. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 42, n. 5, p. 277-9, 2010.

CHEN, Y.; MAO, Y.; ZHOU, D.; HU, X.; WANG, J.; MA, Y. Environmental enrichment and chronic restraint stress in ICR mice: Effects on prepulse inhibition of startle and Y-maze spatial recognition memory. **Behavioural Brain Research**, v. 212, p. 49–55, 2010.

CHEN, Z.; FAN, G.; LUO, Q.; ZHU, C.; HUANG, Y. Effects of Estrogen on ER, NGF, and ChAT Expression in Cerebellum of Aging Female Sprague-Dawley Rat. **Agricultural Science5 in China**, v. 6, p. 368-374, 2007.

CHIZHIKOV, V.; MILLEN, K.J. Development and malformations of the cerebellum in mice. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 80, p. 54–65, 2003.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agents terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, 1: (3) 241-256, 2009.

CRAWLEY, J. N.; GOODWIN, F. K. Preliminary report of a simple animal behavior for the anxiolytic effects of benzodiazepines. **Pharmacol Biochem Behav.**, v. 13, p. 167–170, 1980.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, B.B, Gruissem, W., Jones, R.L. Biochemistry e molecular biology of plant. **American Society of Plant Physiologists**, p.1250-1319, 2000.

EVANS, C. E.; BANSO, A.; ADEYEMO, S. O. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*:an in vitro study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, p. 21–24, 2002.

FAVORETO, R.; GILBERT, B. *Acmella oleracea* (L.)R.K. Jansen (Asteracea) – Jambu. **Revista Fitos**, v 5, n.1, p. 83-90, 2010.

FILGUEIRAS, C. C. MANHÃES, A. C. Effects of colossal agenesis on rotational side preference of BALB/cCF mice in the free swimming test. **Behav Brain Res.**, v. 155, p. 13-25, 2004.

FURZE, R. C.; RANKIN, S. M. Neutrophil Mobilization and Clearance in the Bone Marrow. **Immunology**, v. 123, n. 3, p. 281- 288, 2008.

GERTSCH, J. Immunomodulatory lipids in plants: plant fatty acid amides and the human endocannabinoid system. **PlantaMedica.**, v. 74, p. 638–650, 2008.

GUSMÃO, S. A. L.; GUSMÃO, M. T. A.; SILVESTRE, W. D.; LOPES, P. R. A. Caracterização do cultivo de jambu nas áreas produtoras que abastecem a grande Belém. **Horticultura Brasileira, Fortaleza**, v. 23, n. 2, 2005.

HALLIER-VANUXEEM, D.; PRIETO, P.; CULOT, M.; DIALLO, H.; LANDRY, C.; TÄHTI, H.; CECHELLI, R. New strategy for alerting central nervous system toxicity: Integration of blood-brain barrier toxicity and permeability in neurotoxicity assessment. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 447-453, 2009.

- HARDY, J. D.; STOLL, A. M.; CUNNINGHAM, D.; BENSON, W. M.; GREENE, L. Responses of the rat to thermal radiation. **Am J Physiol.**, v.189, p.1-5, 1957.
- HELLYER, P.; RODAN, I.; BRUNT, J.; DOWNING, R.; HAGEDORN, J. E.; ROBERTSON, S. A. AAHA/AAFP pain management guidelines for dogs and cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 9, p. 466-480, 2007.
- HIND, N.; BIGGS, N. *Acmella oleracea*: compositae. **Curtis's Botanical Magazine**, v. 20, p. 31-39, 2003.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS, P. F. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. V.97, p.1027-1031, 2002.
- ISHOLA, I. O.; AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Cnestis ferruginea* Vahl ex DC (Connaraceae) methanolic root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, p. 55-62, 2011.
- IZQUIERDO, I. **Memória**. 1ª ed. Porto Alegre, Editora: Artmed S.A., 2002.
- KANTERMAN, J.; Sade-Feldman, M.; Baniyash, M. New insights into chronic inflammation-induced immunosuppression. **Seminars in Cancer Biology**, v. 22, p. 307-318, 2012.
- KHAN, I. A. Issues related to botanicals. **Life Sciences**, v. 78, p. 2033 - 2038, 2006.
- KULIG, B.; ALLEVA, E.; BIGNAMI, G.; COHN, J.; CORY-SLECHTA, D.; LANDA, V.; O'DONOGHUE, J.; PEAKALL, D. Animal behavioral methods in neurotoxicity assessment: SGOMSEC joint report. **Environmental health perspectives**, v. 104, v. 2, p. 193-204, 1996.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; MITCHELL, R. N. **Robbins, patologia básica**. Tradução da 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; KURT, A. G. Physiology of pain. **Veterinary Clinics Of North America Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory Lipid Mediators and Insights into the Resolution of Inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2002. 396 p.
- MELO, M. M.; VERCOSA JUNIOR, D.; PINTO, M. C. L.; SILVEIRA, J. B.; FERRAZ, V.; ECCOL, R.; PAES, P. R. O. Intoxicação experimental com extratos de *Mascagnia rigida* (Malpighiaceae) em camundongos. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 631-640, 2008.
- MENGUE, S. S.; MENTZ, L.A.; SCHENKEL, E. P. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 11: 21-35, 2001.
- MOLINATORRES, J., GARCIGLIA, R. S., CHÁVEZ, A. G., DEL RIO, R. E. Purely olefinic alkaloids in *Heliopsis longipes* and *Acmella* (*Spilanthes*) *oppositifolia*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 24, n. 1, p.43-47, 1996.
- MONTENEGRO, M. R.; FRANCO, M. **Patologia: processos gerais**. 4.ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.
- MONTGOMERY, K. C. The elevated plus-maze. **Pharmac. Methodol. Ethology Psychopharmacol.**, v. 53, n.1, p. 334-342, 1958.

- MOOREA, N. D. In search of an ideal analgesic for common acute pain. **Acute Pain**, v. 11, p. 129–137, 2009.
- MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47–60, 1984.
- MURDOCH, B. E. The cerebellum and language: Historical perspective and review. **Cortex**, v. 46, p. 858-868, 2010.
- NASCIMENTO, A. M.; SOUZA, L. M.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. P.; MARIA-FERREIRA, D.; SILVA, L. M.; SASSAKI, G. L.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; CIPRIANI, T. R. Gastroprotective effect and structure of a rhamnogalacturonan from *Acmella oleracea*. **Phytochemistry**, In Press, Corrected Proof, Available online 24 September 2012.
- O'KEEFE, J. A. Place units in the hippocampus of the freely moving rat. **Exp Neurol.**, v.51, p. 78-109, 1979.
- OLIVEIRA, F. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009.
- ONG, H. M.; MOHAMAD, A. S.; MAKHTAR, N. A.; KHALID, M. H.; KHALID, S.; PERIMAL, E. K.; MASTUKI, S. N.; ZAKARIA, Z. A.; LAJIS, N.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 1, p. 227–233, 2011.
- PANDEY, V.; AGRAWAL, V.; RAGHAVENDRA, K.; DASH, A. P. Strong larvicidal activity of three species of *Spilanthes* (Akarkara) against malaria (*Anopheles stephensi* Liston, *Anopheles culicifacies*, species C) and filaria vector (*Culex quinquefasciatus* Say). **Parasitology Research**, v. 102, p. 171–174, 2007.
- PAZAIT, A.; SOUBASI, V.; SPANDOU, E.; KARKAVELAS, G.; GEORGIOU, T.; KARAKIS, P.; GUIBA-TZIAMPURI, O. Evaluation of Long-lasting sensorimotor consequences following neonatal hypoxic-ischemic brain injury in rats: The neuroprotective role of MgSO₄. **Neonatology**, v. 95, p.33-40, 2009.
- PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. O potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vitalle**, v. 19 (1), p. 35-44, 2007.
- POLTRONIERI, M. C.; MULLER, N. R. M.; POLTRONIERI, L. S. **Recomendações para a produção de jambú**. Circular técnica Embrapa Amazônia Oriental, n. 11, 2000.
- PREDIGER, R. D. S.; FERNANDES, M. S.; RIAL, D.; WOPEREIS, S.; PEREIRA, V. S.; BOSSE, T. S.; DA SILVA C. B.; CARRADORE, R. S.; MACHADO, M. S.; CECHINEL-FILHO, V.; Costa-Campos, L. Effects of acute administration of the hydroalcoholic extract of mate tea leaves (*Ilex paraguariensis*) in animal models of learning and memory. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 465–73, 2008.
- RAFFA, R. B.; FRIDERICHS, E.; REIMANN, W.; SHANK, R. P.; CODD, E. E.; VAUGHT, J. L. Opioid and nonopioid components independently contribute to the mechanism of action of tramadol, an "atypical" opioid analgesic. **J Pharmacol Exp Ther**, v.260, p.275-285, 1992.
- RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.
- RATNASOORIYA, W. D.; Diuretic activity of *Spilanthes acmella* flowers in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, n. 2-3, p.371-320, 2004.
- RIOS, M. Y.; AGUILAR-GUADARRAMA, A. B.; GUTIERREZ, M. D. Analgesic activity of affinin, an alkalamide from *Heliopsis longipes* (Compositae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 364–367, 2007.

RITTER, M. R.; SOBIERAJSKI, G. R.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. Plantas medicinais utilizadas no município de Ipê, Rio Grande do Sul. **Rev Bras Farmacogn**, v. 12, p. 51-62, 2002.

ROCHA E SILVA, M.; GARCIA LEME, J. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. **International series of Monographs in Pure and Applied Biology, Modern Trends in Physiological Sciences**. v. 37, p. 1-47, 2006.

ROMANELLI, E. J. **Neuropsicologia aplicada aos distúrbios de aprendizagem: "Prevenção e Terapia"**. Temas em Educação II - Jornada 2003.

ROTELLI, A. E., GUARDIA, T., JUÁREZ, A. O., DE LA ROCHA, N. E., PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological research**. V. 48, p.601-606, 2003.

SERHAN, C. N.; CHING, N.; DYKE, T. E. V. Resolving Inflammation: Dual Anti-inflammatory and Pro-resolution Lipid Mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 349- 361, 2008.

SHARMA, V.; BOONENB, J.; NAGENDRA, S.; THAKURC, C. M.; SPIEGELEERB, B.; DIXITA, V. K. *Spilanthes acmella* ethanolic flower extract: LC-MS alkylamide profiling and its effects on sexual behavior in male rats. **Phytochemistry**, v. 18, n. 2-3, p. 1161- 1169, 2011.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, p. 385-405, 2004.

SIMAS, N. K.; DELLAMORA, E. C. L.; SCHRIPEMA, J.; LAGE, C. L. S.; FILHO, A. M. O.; WESSJOHANN, L.; PORZEL, A.; KUSTER, R. M. Acetylenic 2-phenylethylamides and new isobutylamides from *Acmella oleracea* (L.) R. K. Jansen, a Brazilian spice with larvicidal activity on *Aedes aegypti*. **Phytochemistry Letters**, 6: 67-72, 2013.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; LILIANA ULERMENTZ, L.; ROSPETROVICK, P. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 Ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2010.

SLIKKER JR, W.; BOWYER, J. F. Biomarkers of adult and developmental neurotoxicity. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 206, n. 2, p.255-260, 2005.

STICKEL F.; SEITZ H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Public Health Nutrition**, v. 3, n. 4, p. 501-8, 2000.

SURAPISITCHAT, J.; JEON, K.; YAN, C.; BEAVO, J. A. Differential Regulation of Endothelial Cell Permeability by cGMP via Phosphodiesterases 2 and 3. **Circulation Research October**, v. 12, p. 811-818, 2007.

TALWAR, S.; NANDAKUMAR, K.; NAYAK, P. G.; BANSAL, P.; MUDGAL, J.; MOR, V.; RAO, C. M.; LOBO, R. Anti-inflammatory activity of Terminalia paniculata bark extract against acute and chronic inflammation in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, p. 323-328, 2011.

WHISHAW, I. Q. A comparison of rats and mice in a swimming pool place task and matching to place task some surprising differences. **Physiol. Behav.**, v. 58, n. 4, p. 687-93, 1995.

WILHELM, E. A.; JESSE, C. R.; BORTOLATTO, C. F.; NOGUEIRA, C. W.; SAVEGNAGO, L. Antinociceptive and anti-allodynic effects of 3-ikynyl selenophene on different models of nociception in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 93, p. 419-425, 2009.

ZHENG, L. T.; RYU, G-M.; KWON, B-M.; LEE, W-H.; SUK, K. Anti-inflammatory effects of catechols in lipopolysaccharide-stimulated microglia cells: Inhibition of microglial neurotoxicity. **European Journal of Pharmacology**, v. 588, p. 106-113, 2008.

4 CAPÍTULO I (ARTIGO)

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA E TOXICOLÓGICA DAS FLORES DE

***Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen**

Marcia Silva

Adrielle Bezerra

Aline Lima

Rosa Mourão

Ricardo Oliveira

Atividade farmacológica e toxicológica das flores de *Acmella oleracea* (L.)

R.K.Jansen

Marcia de Oliveira da SILVA^{1*}, Adrielle Nara Serra BEZERRA¹, Aline Evangelista LIMA¹, Rosa Helena Veras MOURÃO¹, Ricardo Bezerra de OLIVEIRA¹.

¹ Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia – Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental - Universidade Federal do Oeste do Pará - Rua Vera Paz, S/N, 68040-250, Santarém – PA, Brasil.
marciaoliveira13@hotmail.com*

Atividade farmacológica e toxicológica das flores de *Acmella oleracea* (L.)

R.K.Jansen

RESUMO

Com o objetivo de avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, foram realizados testes de atividade anti-inflamatória (edema de pata), antinociceptiva (teste de retirada da cauda) e de toxicidade sub-crônica (labirinto aquático de Morris, caixa claro-escuro, labirinto em Y, campo aberto e *rota-rod*). O extrato aquoso das flores de *A. oleracea* nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg não mostrou efeitos tóxicos sobre memória e coordenação motora dos animais, porém, causou um efeito ansiogênico nos animais no teste de campo aberto. Nos testes farmacológicos, o extrato apresentou efeito antiedematogênico e antinociceptivo. Os resultados aqui apresentados sugerem uma possível ligação com os metabólitos secundários encontrados nessa espécie, indicando a necessidade de estudos para a elucidação dos compostos encontrados nas flores de *A. oleracea* e o mecanismo de ação de cada um deles.

Palavras-Chave: *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen, neurotoxicidade, atividades antiedematogênica e antinociceptiva.

ABSTRACT

Aiming to evaluate the pharmacological and toxicological effects of aqueous extract of flowers *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen, tests were performed antiedematogenic activity (paw edema), antinociceptive (tail flick test) and toxic sub-chronic (Morris water maze, box light / dark Y-maze, open field and *rota-rod*). The aqueous extract of the flowers of *A. Oleracea* at doses of 50, 100 and 200 mg / kg showed no toxic effects on memory and motor coordination of the animals, but caused an anxiogenic effect in animals in the open field test. In pharmacological tests, the extract showed antinociceptive effect and antiedematogenic. The results presented here suggest a possible link with the secondary metabolites found in this species, indicating the need for studies to elucidate the compounds found in flowers of *A. oeracea* and the mechanism of action of each.

Keywords: *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, neurotoxicity, and antinociceptive activities antiedematogenic.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas com fins medicinais para prevenção, tratamento e cura de diversas doenças é registrado desde as civilizações mais antigas como prática medicinal da humanidade (Bhandare et al. 2010). Os produtos naturais têm exercido importante papel na medicina popular e também na medicina moderna, sendo matéria prima de compostos com importantes atividades biológicas (Moura-costa et al. 2012). Apesar do grande avanço da medicina nos últimos séculos, ainda existem obstáculos na sua utilização por populações carentes que enfrentam a falta de acesso ao atendimento hospitalar, exames e aos medicamentos industrializados. Tais motivos, associados com a fácil obtenção e grande tradição no uso de plantas medicinais contribuem para o crescimento da fitoterapia no tratamento de doenças (Evans et al. 2002; Brandão et al. 2008).

A maior fonte de substâncias bioativas, sintetizado pelas plantas são os seus metabólitos secundários (Ghangal et al. 2009; Pavarini et al 2012) . Por muito tempo estes foram considerados como produtos de excreção do vegetal. Atualmente, entretanto, sabe-se que os metabólitos secundários além de serem substâncias diretamente envolvidas na adequação do vegetal a seu meio, também apresentam atividades biológicas interessantes (Simões et al. 2010).

Dentre as várias espécies vegetais utilizadas com fins fitoterápicos, encontram-se as espécies da família Asteraceae que se destaca por ser uma família altamente diversificada, onde a *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen possui inúmeras aplicações na medicina popular e culinária amazônica, e as atividades farmacológicas das espécies deste gênero tem sido alvo de estudos (Ley et al. 2006; Ekanem et al. 2007; Wu et al. 2008; Chakraborty et al. 2010). Porém, estudos que avaliem possíveis efeitos tóxicos

sobre a memória, locomoção, coordenação motora e ansiedade não são encontrados na literatura, demonstrando a importância de pesquisas que investiguem o potencial toxicológico desta e de outras espécies, permitindo assim, uma utilização de forma segura. Desta forma, este trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos neurotóxicos do uso sub-crônico do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, e corroborar com pesquisas já realizadas em representantes deste gênero na avaliação de seu potencial farmacológico, demonstrando assim, os efeitos desta espécie encontrada na Amazônia, ressaltando que a pesquisa sobre sua toxicidade é inédita, não sendo encontrados registros na literatura sobre tais estudos na região amazônica, além de possuir grande importância no sentido de contribuir com uma melhor avaliação dos benefícios e danos causados pelo uso desta planta.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL BOTÂNICO E OBTENÇÃO DO EXTRATO AQUOSO

As amostras de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen, foram coletadas na comunidade de Diamantino (S 02° 29'46,7''/ W 0,54° 40'04,8'') - Santarém-Pará, uma das maiores fornecedoras de jambú para diversas feiras livres da cidade de Santarém. As exsiccatas obtidas na coleta foram identificadas e depositadas no Herbário Embrapa Amazônia Oriental/Belém sob o código (IAN): 188088. As flores previamente selecionadas foram secas em estufa a 40°C e em seguida trituradas em moinho para obtenção de um pó de fina granulação. O extrato aquoso foi obtido a partir da diluição desse pó em água destilada na proporção aproximada de 1/20 (p/v) e mantido sob uma

placa quente a $70^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ por 2h e meia. Em seguida, o material foi filtrado e posteriormente liofilizado para sua utilização nos ensaios biológicos.

CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A presença dos grupos de metabólitos secundários (cumarina e flavonóides) no extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen foi determinada por CCD utilizando placas de gel de sílica como fase fixa e empregando-se diversos sistemas de desenvolvimento, padrões e reveladores apropriados (Tabela 1).

ANIMAIS

Foram utilizados ratos Wistar machos, pesando 100-200g e camundongos machos da raça Swiss, com peso entre 20-35g provenientes do biotério do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (UFOPA)/ Santarém e biotério do Campus da UFOPA de Oriximiná. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com livre acesso a água e alimentação, ciclo claro-escuro de 12h cada e temperatura controlada ($24 \pm 2^{\circ}\text{C}$).

Todos os experimentos obedeceram aos princípios éticos da manipulação animal, de acordo com as normas e princípios do uso de animais de experimentação em pesquisa, com aprovação fornecida pelo Comitê de Ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Estadual do Pará (UEPA) sob o protocolo de nº 12/12 de 26/04/2012.

TESTES NEUROTÓXICOS (COMPORTAMENTAIS)

LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (MORRIS, 1984)

Para avaliar a memória espacial utilizamos quatro grupos de ratos machos Wistar que receberam por via oral (v.o) durante 20 dias, o extrato aquoso da flor de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e o grupo controle recebeu somente água 1 ml/ kg. Todos os grupos experimentais foram constituídos por 9 animais. Os animais durante todo o período do experimento tiveram água e comida *ad libitum*.

Após 20 dias de tratamento, a memória e aprendizagem espacial dos animais foram avaliadas no labirinto aquático de Morris, que consiste em uma caixa d'água de 500 L com água até 20 cm da borda a $25\pm 1^{\circ}\text{C}$, sendo adicionada tinta branca não tóxica para que a superfície se tornasse opaca. A caixa foi dividida em quatro quadrantes imaginários Norte (N), Sul (S), Leste (L) e Oeste (O) que serviram como ponto de partida para os animais durante o teste. Uma plataforma (10 cm x 10 cm) foi escondida 1 cm abaixo da superfície da água em um local fixo (entre os pontos S e L). Próximo a caixa d'água (noroeste ao observador) foi colocada uma lâmpada incandescente (60W), que serviu como auxílio para localização da plataforma, assim como os demais objetos presentes no laboratório.

No primeiro dia de teste foi realizado o treino; neste momento os animais aprenderam a localizar a plataforma submersa. Os animais foram colocados individualmente na caixa d'água em cada um dos quadrantes. Após serem colocados na

água tiveram a oportunidade de nadar livremente, observando os pontos de referência para procurar a plataforma por 120 segundos ou até que a encontrassem; os que não encontraram durante o tempo pré-estabelecido foram colocados manualmente sob a plataforma por 10 segundos para visualização do ambiente. No segundo dia, após 24h do treino, foi realizado o teste do labirinto aquático, onde se observava o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma em cada um dos quatro quadrantes.

CAIXA CLARO/ESCURO (LIGHT/DARK BOX) (DENOBLE ET AL. 1986)

O TCCE é um modelo experimental de esQUIVA passiva utilizado para a avaliação da memória aversiva. A CCE foi composta por uma arena em acrílico (46 x 27 x 30cm de altura) dividida em dois compartimentos: o maior (31 x 27 x 30 cm) branco e iluminado diretamente por uma lâmpada fluorescente (fria) de 20 W e o menor (15 x 27 x 30 cm) preto e dotado de tampa. Os dois compartimentos eram separados por uma placa de acrílico preta de 27 x 30cm (base x altura) com uma abertura de 7,5 x 7,5cm localizada no centro, possuindo um fundo formado por barras, ligadas a um dispositivo eletrônico para liberação de choque. Para realização deste teste utilizamos ratos Wistar (n=9) que foram tratados como descrito anteriormente.

No primeiro dia de testes foi realizado um treinamento, onde cada rato foi colocado individualmente no centro do compartimento claro. No momento em que ocorria transição do compartimento claro para o escuro, definida como a passagem das quatro patas do animal pela divisória, o animal recebia um choque de 2 mA, durante 2 s, para demonstrar que o ambiente escuro não era seguro.

A retenção do aprendizado foi testada após 24h, quando os animais foram colocados no compartimento claro por um período máximo de 5 minutos e o tempo de latência para a entrada no escuro foi registrado (os animais nesta fase não levaram choque), sendo avaliada desta forma a memória tardia dos animais.

LABIRINTO EM Y (SARTER ET AL., 1988)

Esse teste avalia a memória de curta duração e reconhecimento espacial. O labirinto em Y consiste num equipamento de madeira na forma de Y, com braços medindo 10 cm de largura e 34cm de altura, com um braço de 34 cm de comprimento e dois com 43 cm, tendo um ângulo de 120° entre os mesmos. Para a realização do experimento foram formados quatro grupos de ratos Wistar machos (n=9) que receberam o tratamento conforme já descrito. Após 20 dias de administrações os animais foram colocados individualmente no labirinto por um período de 8 minutos, registrando-se a sequência de entradas nos braços. As informações foram analisadas para determinar o número de entradas sem repetições. O sucesso do teste é indicado pela alta taxa de alternância nos grupos controle, indicando que os animais podem se lembrar em qual braço eles entraram por último. O resultado foi obtido através da seguinte fórmula matemática (alternações espontâneas = n° de acertos/total). Entre cada sessão, o labirinto foi higienizado com uma solução de álcool a 20% e secado com toalhas de papel.

AVALIAÇÃO DA COORDENAÇÃO MOTORA (TESTE DA BARRA GIRATÓRIA)

O teste da barra giratória (rota-rod) foi proposto por Dunham e Miya (1957), sendo apropriado para detectar a ação de agentes farmacológicos sobre a coordenação motora dos animais. O aparelho de Rota-rod é constituído de uma barra giratória, não escorregadia, com 45 cm de altura, 54 de largura e 35 de comprimento; dividida em quatro compartimentos iguais, sendo um aparelho motorizado, possuindo uma velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.).

Neste teste foram utilizados quatro grupos de Ratos Wistar (n=9) submetidos durante 20 dias ao tratamento descrito anteriormente. Para que ocorresse a habituação e aprendizado, após o vigésimo dia de administração foi realizado um treino com os grupos, esse treino foi dividido em três séries de dois minutos. Após 24h, os animais foram submetidos ao teste, onde cada animal foi colocado novamente em três séries de dois minutos sobre a barra giratória e o resultado foi obtido pela média de tempo em segundos de permanência de cada grupo no aparelho.

CAMPO ABERTO – BROADHURST, (1960)

Como o objetivo de avaliarmos o comportamento exploratório e ansiolítico de camundongos submetidos à administração sub-crônica do extrato aquoso de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, utilizamos o TCA. O TCA consiste de uma arena circular branca, com 40 cm de diâmetro e 28 cm de altura. Três círculos concêntricos dividem o fundo dessa arena em três partes que, por sua vez, são subdivididas por segmentos de reta em vinte e cinco áreas aproximadamente iguais.

Para realização do experimento foram formados quatro grupos (n=7) de camundongos Swiss, os grupos testes receberam via oral o extrato aquoso da flor de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg durante 14 dias e o grupo controle recebeu somente água. Após o 7º e 14º dia de administração, todos os animais foram colocados individualmente no centro da arena e observados durante 5 minutos. A arena foi limpa com álcool a 20% após cada animal ser retirado, para evitar que o cheiro de urina e fezes interferissem no teste.

Nesse teste foram observados:

- Número de cruzamentos (número de quadrantes percorridos): corresponde a colocação das quatro patas dentro de um quadrante que compõem uma subdivisão do chão da arena;
- Número de levantamentos do animal sobre as patas traseiras;
- Tempo em segundos de total ausência de movimentos;
- Número de auto-limpeza;
- Número de bolos fecais.

TESTES FARMACOLÓGICOS

TESTE DA LATÊNCIA PARA O REFLEXO DE RETIRADA DA CAUDA (TAIL-FLICK) (D'AMOUR E SMITH, 1941)

Este modelo experimental é utilizado para a avaliação da atividade antinociceptiva, permitindo o estudo de drogas com atividades semelhantes aos opióides, mediante a avaliação do tempo, em segundos (s), que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência de um estímulo térmico doloroso. Para o teste,

utilizamos o analgesímetro Insight, modelo EFF 300, que permitem o controle da intensidade do calor.

Para a realização do teste foram formados cinco grupos de ratos Wistar machos, cada um com (n=7), onde os animais controles foram tratados via oral, com água (1ml/kg), morfina (5mg/kg) e os grupos testes com o extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, 30 minutos após a leitura basal. Cada animal era colocado dentro de um contensor e sua cauda posicionada sobre o filamento metálico de aquecimento entre os dois sensores. As medidas da latência (tempo em segundos de permanência da cauda sobre o filamento metálico) foram tomadas a cada 30 minutos por um período de duas horas.

EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA 1% - WINTER ET AL. (1962)

Ratos Wistar machos receberam (v.o.) os seguintes tratamentos: extrato aquoso da flor de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen (50, 100 e 200 mg/kg.; a droga padrão Indometacina 10mg/kg; e o grupo controle somente água 1 ml/ kg, cada grupo foi constituído por 7 animais.

Após 1h, cada animal recebeu na região subplantar da pata posterior direita uma injeção 0,1 ml de carragenina diluída a 1% em solução salina, após a aplicação da carragenina, o volume da pata (mL) foi medido nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h, usando um pletismômetro digital insight, modelo EFF 304. O volume foi obtido através da subtração do volume final menos o volume inicial (VF – VI) de cada pata em cada um dos tempos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como (media \pm e.p.m) e analisados através dos testes “t” de Student e ANOVA (seguida do teste de Dunnett). Valores de $p \leq 0,05$ são considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

Na Tabela 2 estão descritos dados obtidos na prospecção fitoquímica realizada com o extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, onde foi detectada a presença de cumarina e flavonóides.

EFEITOS TOXICOLÓGICOS

Quando comparamos a performance dos grupos no teste do labirinto aquático, verificamos que não houve diferença significativa na média de tempo para encontrar a plataforma entre os animais que receberam o extrato aquoso de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg e o grupo controle ($p > 0,05$) (Figura 1).

A Figura 2 mostra que a diferença na média de tempo entre os grupos não foi alterada em nenhuma das doses testadas ($p > 0,05$), quando aplicado o teste da caixa claro-escuro, sugerindo que não houve alteração de memória neste modelo experimental.

A administração do extrato aquoso de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/Kg, também não causou nenhuma alteração nos animais avaliados no teste do Labirinto em Y, não ocorrendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), entre os grupos tratados e o grupo controle (Figura 3), sugerindo

que a memória operacional e de reconhecimento espacial dos animais do grupos tratados não sofreu nenhuma alteração.

Os dados coletados no teste de coordenação motora (rota-rod) para avaliação de possíveis efeitos sedativos ou interferência na coordenação motora dos animais, demonstraram que não houve diferença significativa entre os grupos experimentais e controles ($p>0,05$) (Figura 4). Os animais aparentemente demonstraram similar capacidade de locomoção, equilíbrio e força.

No teste campo aberto, os camundongos dos grupos testes apresentaram ansiedade. Animais em estado ansiogênico apresentam alta atividade e tendência em permanecer nas regiões centrais do equipamento. Foi observado uma diferença significativa entre os três grupos no número de cruzamentos no centro e periferia do aparelho quando comparados com o grupo controle ($p<0,01$) e no número de levantamentos ($p<0,01$), exceto no grupo de 100mg/kg no 14º dia de realização do teste. Esses resultados refletiram em número superior de quadrantes totais percorridos pelos grupos testes no 7º dia de realização do teste, 50mg/kg: $96\pm 5,6$, 100mg/kg: $106\pm 3,7$, 200mg/kg: $93\pm 9,4$ em comparação ao grupo controle $76\pm 7,3$ e no 14º dia, onde os grupos apresentaram as seguintes médias 50mg/kg: $88\pm 10,4$, 100mg/kg: $94\pm 5,5$, 200mg/kg: 82 ± 6 em comparação ao grupo controle $57\pm 6,9$. Na quantidade de auto-limpezas ocorreu diferença significativa entre grupo controle e tratado nas doses de 200 mg/kg no 7º dia de realização do teste e na dose de 50 mg/kg no 14º dia. Não havendo diferença entre os grupos no parâmetro de quantidade bolos fecais ($p>0,05$) (Figura 5).

EFEITOS FARMACOLÓGICOS

Os grupos testes que receberam o extrato de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$), quando comparados com o grupo controle tratado com solução salina nos quatro momentos de avaliação da antinocicepção (30, 60, 90 e 120m) após a administração dos tratamentos (Figura 6). O período de permanência da cauda dos animais do grupo controle foi de 4.85, 6.78, 5.83 e 6.78s; o grupo da morfina foi de 12, 14.6, 11.7 e 10.3s; o grupo de 50mg/kg foi de 12.9, 11.8, 11.5 e 11.1s; o grupo de 100mg/kg foi de 11.6, 12, 11.5 e 11.7s; e o grupo de 200mg/kg foi de 13.5, 9.6, 10.9 e 10.5s.

O extrato aquoso de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen, na dose oral de 50, 100 e 200 mg/kg, inibiu ($p < 0,05$) o desenvolvimento do edema de pata induzido por carragininina nas primeira, segunda e quarta horas, quando comparado com o grupo controle (Figura 7).

DISCUSSÃO

Na pesquisa da atividade farmacológica e toxicológica de qualquer planta, é essencial a realização do perfil cromatográfico para determinação dos compostos presentes nesta espécie, permitindo assim, uma posterior correlação com resultados obtidos em ensaios biológicos. Os resultados obtidos na CCD do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, mostraram a presença de cumarinas e

flavonóides. Armond (2007) e Borges (2009), realizando o perfil cromatográfico do óleo essencial das espécies *Acmella oleracea* L. e *Acmella ciliata* Kuth, também detectaram a presença de flavonóides, cumarina, e ainda taninos. Pesquisando a classe de metabólitos secundários no extrato aquoso de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen através de CCD, Félix-Silva (2012) e colaboradores encontraram em suas triagens fitoquímicas taninos, cumarinas, fenóis e alcalóides. Segundo tais autores estudos fitoquímicos sistemáticos das folhas e flores desta espécie são escassos na literatura, o que limita a quantidade de dados referenciais para comparação.

Os medicamentos de origem natural têm sido cada vez mais utilizados, por serem considerados não tóxicos e seguros, porém reações adversas e intoxicações associada ao uso de medicamentos à base de plantas têm sido cada vez mais relatados, causando danos no fígado, coração, sangue, rim, sistema nervoso central, pele e, e até mesmo com ação carcinogênica (Shin et al. 2010; Chen et al. 2011).

Ao avaliarmos possíveis efeitos adversos de um tratamento, a neurotoxicidade é um dos eventos toxicológicos mais graves, pois danos gerados, até mesmo a um pequeno número de neurônios, podem ter profundas consequências para o desempenho global do organismo (Ushakova et al. 1995). Em alguns modelos animais, tratamentos crônicos com a administração de baixas doses de substâncias neurotóxicas produzem déficit cognitivo antes do aparecimento dos sinais motores (Deumens et al. 2002).

Em nosso estudo, observamos que os ratos adultos expostos sub-cronicamente durante 20 dias ao tratamento oral do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, as doses de 50, 100 e 200 mg/kg não apresentaram sinais de neurotoxicidade, apresentando médias semelhantes aos controles quando avaliados no

teste do labirinto aquático, o que indica que não houve diminuição na capacidade de aprendizado e memorização, sugerindo integridade do hipocampo, área relacionada aos processos cognitivos, em especial, a memória espacial (Eichenbaum, 2000).

Outro modelo de avaliação da memória é o TCCE. Neste teste, não foi observado aumento significativo no número de entradas no compartimento escuro, após 24 h do treino, sugerindo que os animais tratados com o extrato aquoso permaneceram com memória de curta duração íntegra. Segundo Sakamoto e colaboradores (2004) a memória de curta duração pode ser avaliada através de testes de esquiva passiva, como o TCCE, estando o hipocampo e amígdala entre as áreas associadas a esta função.

Pesquisas com diversos modelos animais têm mostrado que a formação da memória envolve uma série de alterações bioquímicas em várias áreas do SNC, entre as quais se destaca o hipocampo (Schwabe et al., 2009). Os eventos bioquímicos envolvidos na formação da memória incluem, inicialmente, a ativação de receptores glutamatérgicos e a ativação de cascatas bioquímicas nos neurônios. Em ratos, esses eventos bioquímicos, ou alguns deles, ocorrem no hipocampo, na amígdala e em diferentes áreas corticais quando os animais são submetidos a um novo aprendizado (Izquierdo e Medina, 1997). Essas áreas do SNC aparentemente não foram afetadas pelo uso sub-crônico do extrato aquoso de *Acmella oleracea* quando aplicado os modelos experimentais aqui propostos, pois animais que venham a apresentar alguma lesão nessas regiões do SNC possuem significativa deficiência no desempenho de tarefas que envolvam memória e aprendizado, não conseguindo atingir o mesmo nível de desempenho de animais controle (Bueno, 2005).

No teste Labirinto em Y, quando avaliamos a memória de curta duração e de reconhecimento espacial dos animais, as médias de entradas corretas entre os grupos foram semelhantes, sugerindo que não houve nenhum déficit de memória nos animais tratados com o extrato aquoso de *A. oleracea*.

Segundo Yao et al. (2004), os flavonóides, substâncias encontradas na espécie *A. oleracea*, são compostos polifenólicos considerados antioxidantes que auxiliam nas atividades da vitamina C, melhorando sua absorção e protegendo contra a oxidação (Bastianetto e Quirion 2002; Yodim 2002). Pesquisas sobre o dano oxidativo no processo de envelhecimento, sugerem que o aumento da ingestão de antioxidantes pode trazer benefícios para a manutenção da função cerebral. E que a suplementação de longo prazo com extratos de plantas com propriedades antioxidantes retarda os déficits cognitivos relacionados à idade em roedores (Bickford et al. 2000).

Chen e colaboradores, em 2009, mostraram que polifenóis, presentes no chá verde, atenuam disfunções cognitivas induzidas pelo estresse fisiológico. Houve melhora da performance dos animais em diferentes tarefas comportamentais. Já o ácido ascórbico demonstrou atenuar déficits de aprendizado espacial induzidos pela escopolamina no teste do water maze (Harrison et al., 2009). Portanto, é provável que o uso mais prolongado do extrato aquoso das flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, no qual encontramos flavonóides, poderia ter melhorado o desempenho dos grupos testes em relação aos controles nos testes realizados, uma vez que, efeitos antioxidantes do Jambú já têm sido relatados (Wongsawatkul et al. 2008).

No TCA, avaliamos sete parâmetros. O número de cruzamentos entre centro e periferia da arena que avaliam a ansiedade e que podem ser alterados por fármacos com atividade ansiolítica/ansiogênica; o número total de cruzamentos, que avalia a

atividade exploratória do animal que pode ser afetada por fármacos com ação no SNC ou relaxantes musculares periféricos; o número total do levantar, número de auto-limpeza e o tempo parado, que avaliam o grau de sedação ou medo (ansiedade) e podem ser alterados por fármacos com atividade ansiolítica/ansiogênica; bem como o número de bolos fecais, que pode ser alterado por diferentes grupos de fármacos, tais como ansiolíticos, ansiogênicos, dentre outros, como espasmolíticos ou espasmogênicos (Siegel, 1946; Archer, 1973). Nesse modelo experimental nossos resultados demonstraram que os animais tratados, tiveram um comportamento de locomoção mais localizado nos quadrantes centrais e que o processo de exploração dos mesmos ao analisarmos o número de levantamentos, foi significativamente inferior quando comparado com o grupo controle, o que resultou em maior número de quadrantes percorridos pelos grupos tratados. Segundo Franco et al. (2005), a mobilidade é função do grau de excitabilidade do SNC e uma diminuição desse parâmetro é sugestiva de uma atividade sedativa e um aumento com um efeito ansiolítico. Durante o experimento não foi registrado nenhuma imobilidade ou alteração no número de bolos fecais entre os grupos.

No teste de locomoção (rota-rod), observamos que os animais controles e testes apresentaram uma média de tempo semelhante na permanência sobre a barra giratória. Nossos resultados nas doses de 100 e 200 mg/kg corroboram com Ong et al. (2011), no qual a administração oral de 100 mg/kg de extrato metanólico de *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass, não causou alterações na coordenação motora dos animais quando submetidos ao teste rota-rod.

Ong et al. (2011) pesquisando a ação antinociceptiva do extrato metanólico de *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass, planta que é muito utilizada na Malásia

para aliviar a dor, no tratamento de úlceras na boca, dor de dente, dor de garganta e dor de estômago, obtiveram em seus resultados respostas antinociceptivas em todos os modelos utilizados, com a administração do extrato nas doses de 3, 10, 30 e 100 mg/kg, indicando que a espécie possui atividade antinociceptiva em nível central e periférico. Em nossos resultados, obtidos no teste de latência para o reflexo de retirada da cauda, também observamos uma ação antinociceptiva do extrato aquoso de flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, sugerindo que tais efeitos derivam, provavelmente da ação dos flavonóides presentes nas suas flores, além do Spilantol, substância já descrita na literatura como responsável pela ação de dormência que as folhas e flores desta espécie ocasionam na cavidade oral (Ley et al., 2006 e Boonen 2010).

Analisando a ação antiinflamatória do extrato aquoso de flores de *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen, através do teste de edema de pata, obtivemos resultados eficazes na inibição da formação dos edemas na primeira, segunda e quarta hora nos três grupos testes quando comparados com o grupo controle que recebeu somente água.

As cumarinas também denominadas de benzopironas representam uma grande classe de compostos fenólicos encontrados principalmente em plantas, tendo se mostrado responsável pelos efeitos antiinflamatórios encontrados em diversas espécies (Corrêa et al. 2008; Luchini, 2009;) sendo tal metabólito citado na literatura como possuidor de atividade antiinflamatória (Schijlen et al. 2004; Ferrucci et al. 2006). Assim, podemos sugerir que o efeito antiedematogênico encontrado neste trabalho, pode estar relacionado com a presença da cumarina no extrato aquoso, além da presença da alquilamida espilantol, um dos maiores constituintes encontrados na espécie *Acmella*

oleracea, indicado como responsável pelos efeitos antiinflamatórios e analgésicos encontrados nesta espécie (Wu et al. 2008).

CONCLUSÕES

Com base nos resultados apresentados, demonstrou-se que as flores da espécie *Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen possuem compostos com elevado potencial farmacológico ao analisarmos sua atividade antiinflamatória e analgésica, corroborando com pesquisas já realizadas com representantes desta espécie encontradas em outras regiões do Brasil e do mundo. Embora não tenha sido registrado nenhum sinal de neurotoxicidade nos testes de memória, coordenação motora e locomoção, a presença de um efeito ansiogêncio no teste de locomoção (TCA) sugere que mais estudos são necessários a fim de esclarecer esse possível sinal de toxicidade, e quais são os compostos responsáveis por esses efeitos.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, a Universidade Federal do Oeste do Pará e as equipes técnicas e científicas do Laboratório de Bioprospecção e Biologia experimental (LABBEx).

BIBLIOGRAFIA CITADA

- Archer, J. 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Anim. Behav.*, 21(2): 205-235.
- Armond, C. 2007. *Indicadores químicos, crescimento e bioeletrografias de plantas de jambú (Acmella oleracea L.), campim-limão (Cymbopogon citratus (DC) Stapf) e folhada-fortuna (Bryophyllum pinnatum (Lam.) Okem) submetidas a tratamentos homeopáticos*. Tese de doutorado. Universidade Federal de Viçosa, MG.
- Bastianetto, S.; Quirion, R. 2002. Natural extracts as possible agents of brain aging. *Neurobiol Aging*, 23(5): 891-897.
- Bhandare, A.M.; Kshirsagar, A.D.; Vyawahare, N.S.; Hadambar, A.A.; Thorve, V.S. 2010. Potential analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. *Food Chem. Toxicol.*, 48: 3412-3417.
- Bickford, P.C.; Gould, T.; Briederick, L.; Chadman, K.; Pollock, A.; Young, D.; Shukitt-Hale, B.; James Joseph, J. 2000. Antioxidant-rich diets improve cerebellar physiology and motor learning in aged rats. *Brain Research*, 866: 211-217.
- Boonen, J.; Baert, B.; Burvenich, C.; Blondeel, P.; Saeger, S.; Spiegeleer, B. 2010. LC-MS profiling of N-alkylamides in *Spilanthes acmella* extract and the transmucosal behaviour of its main bio-active spilanthol. *J Pharm Biomed Anal*, 53(3): 243-9.
- Borges, L.S. 2009. *Biomassa, teores de nutrientes, espilantol e atividade antioxidante em plantas de Jambú (Acmella ciliata Kuth) sob adubações mineral e orgânica*. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu.
- Brandão, M.G.L.; Zanetti, N.S.N.; Oliveira, P.; Graef, C.F.F.; Santos, A.C.P.; Monte-Móre, R.L.M. 2008. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. *Journal of Ethnopharmacology*, 120: 141-148.
- Broadhurst, P. L. *Experiments in psycho genetics. Experiments in Personality*. Londres: Routledge and Paul, 1960.
- Bueno, J.L.O.; Costa, V.C.I.; Xavier, G.F.; Dima, L.L. Aquisição de uma Tarefa Temporal (DRL) por Ratos Submetidos a Lesão Seletiva do Giro Denteado. 2005. *Psicologia: Reflexão & Crítica*, 19(1), 159-165.
- Chakraborty, A.; Devi, R.K.B.; Sanjebam, R.; Khumbong, S.; Thokchom, I.S. 2010. Preliminary studies on local anesthetic and antipyretic activities of *Spilanthes acmella* Murr. in experimental animal models. *Indian J. Pharmacol* 42: 277-279.

Chen, W.Q.; Zhao, X.L.; Hou, Y.; Li, S.T.; Hong, Y.; Wang, D.L.; Cheng, Y.Y. 2009. Protective effects of green tea polyphenols on cognitive impairments induced by psychological stress in rats. *Behav. Brain Res.*, 24: 71-76.

Chen, X.W.; Serag, E.S.; Sneed, K.B.; Zhou, S.F. 2011. Herbal bioactivation, molecular targets and the toxicity relevance. *Chemico-Biological Interactions*, 192: 161–176.

Corrêa, M.F.P.; Melo, G.O.; Costa, S.S. 2008. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 18, 785-797.

D' amour, F. E.; Smith, D. L. 1941. A method for determining loss of pain sensation. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 72, 74-79.

Denoble, V.J.; Repetti, S.J.; Gelpke, L.W.; Wood, L.M.; Keim, K.L. 1986. Vinpocetine: nootropic effects on scopolamine-induced and hypoxia-induced retrieval deficits of a step-through passive avoidance response in rats. *Pharmacol Biochem Behav.*, 24 (4): 1123-1128.

Deumens, R.; Blokland, A.; Prickaerts, J. 2002. Modeling Parkinson's disease in rats: an evaluation of 6-OHDA lesions of the nigrostriatal pathway. *Exp Neurol*, 175: 303-317.

Dunham, N.W.; Miya, T.S. 1957. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, 46: 208-209.

Eichenbaum, H. 2000. A cortical-hippocampal system for declarative memory. *Nat Rev Neurosci.*,1: 41-50.

Ekanem, A.P.; Wang, M.; Simon, J.E.; Moreno, D.A. 2007. Antiobesity properties of two African plants (*Afromomum meleguetta* and *Spilanthes acmella*) by pancreatic lipase inhibition. *Phytother. Res.* 21: 1253–1255.

Evans, C. E.; Bansa, A.; Adeyemo, S. O. 2002. Efficacy of some nupe medicinal plants against *Salmonella typhi*:an in vitro study. *Journal of Ethnopharmacology*, 80: 21–24.

Ferrucci, L.; Cherubini, A.; Bandinelli, S.; Bartali, B.; Corsi, A.; Lauretani, F.; Martin, A.; Andres-Lacueva, C.; Senin, U.; Guralnik, J.M. 2006. Relationship of plasma polyunsaturated fatty acids to circulating inflammatory markers. *J Clin Endocrinol Metab.*, 91 (2): 439-446.

Félix-silva, J.; Tomaz, I.M.; SILVA, M.G.; Santos. 2012. Identificação botânica e química de espécies vegetais de uso popular no Rio Grande do Norte, Brasil. *Rev. Bras. Pl. Med.*, 14 (3):548-555.

Franco, C.I.F.; Morais, L.C.S.L.; Quintans-júnior, L.J.; Almeida, R.N.; Antonioli, A.R. 2005. CNS pharmacological effects of the hydroalcoholic extract of *Sida cordifolia* L. leaves. *Journal of Ethnopharmacology.*, 98: 275–279.

- Ghangal, R.; Raghuvanshi, S.; Sharma, P.C. 2009. Isolation of good quality RNA from a medicinal plant seabuckthorn rich in secondary metabolites. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47: 1113–1115.
- Harrison, F.E.; Hosseini, A.H.; Dawes, S.M.; Weaver, S.; May, J.M. 2009. Ascorbic acid attenuates scopolamine-induced spatial learning deficits in the water maze. *Behav. Brain Res.*, 205, 550-558.
- Izquierdo, I.; Medina, J.H. 1997. Memory formation: The sequence of Biochemical Events in the hippocampus and its connection to activity in other brain structures. *Neurobiol Learn Mem.*, 68: 285-316.
- Ley, J.P.; Krammer, G.; Looft, J.; Reinders, G.; Bertram, H. 2006. Structure–activity relationships of trigeminal affects for artificial an naturally occurring alkalamides related to spilanthol. *Dev. Food Sci.*, 43: 21–24.
- Luchini, A.C. 2009. Avaliação dos efeitos da cumarina e da 4-hidroxi-cumarina e de diferentes associações com a sulfassalazina no modelo de colite induzida por ácido trinitrobenzenosulfônico (TNBS) em ratos. Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu.
- Morris, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. 1984. *Journal Neuroscience Methods*, 11: 47–60.
- Moura-Costa, G.F.; Nocchi, S.R.; Ceole, L.F.; Mello, J.C.P.; Nakamura, C.V.; Filho, B.P.D.; Temponi, L.G.; Ueda-Nakamura, T. 2012. Antimicrobial activity of plants used as medicinal on an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná , Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 143: 631–638.
- Ong, H.M.; Mohamad, A.S.; Makhtar, N.A.; Khalid, M.H.; Khalid, S.; Perimal, E.K.; Mastuki, S.N.; Zakaria, Z.A.; Lajis, N.; Israf, D.A.; Sulaiman, M.R. 2011. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. *Journal of Ethnopharmacology*, 133(1): 227–233.
- Pavarini, D.P.; Pavarini, S.P.; Niehues, M.; Norberto Peporine Lopes, N.P. 2012. Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. *Animal Feed Science and Technology*, 176: 5–16.
- Sakamoto, M.; Kakita, A.; Oliveira, R.B.; Pan, H.S.; Takahashi, H. 2004. Dose-dependent effects of methylmercury administered during neonatal brain spurt in rats. *Developmental Brain Research*, 152: 171– 176.
- Sarter, M.; Bodewitz, G.; Stephens, D.N. 1988. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behavior by antagonist but not inverse agonist and antagonist β -carboline. *Psychopharmacology.*, 94, 491–495.
- Schijlen, E.G.W.M.; Ric De Vos, C.H.; Van Tunen, A.J.; Bovy, A.G. 2004. Modification of flavonoid biosynthesis in crop plants. *Phytochemistry*, 65: 2631-2648.

Schwabe, L.; Böhringer, A.; Wolf, O.T. 2009. Stress disrupts context-dependent memory. *Learn Mem.*, 16: 110-113.

Shin, J.W.; Park, H.J.; Kwon, M.; Son, C.G. 2010. Scientific evaluation of the chronic toxicity of the herbal medicine CGX in beagle dogs. *Food and Chemical Toxicology*, 48: 743–749.

Sielgel, P.S. 1946. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. *J. Psychol.*, 21: 227-236.

Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Ulermentz, L.; Rospetrovick, P. 2010. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC.

Ushakova, G.A.; Berezin, V.A.; Skibo, G.G. 1995. Neural cell adhesion molecule (NCAM) distribution may predict the effect of neurotoxins on the brain. *Official Journal of the International Society on Toxinology*, 33: 577-581.

Winter, C.A.; Risley, E.A.; Nuss, G.W. 1962. Carragenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 111: 544– 547.

Wongsawatkul, O.; Prachayasittikul, S.; Isarankura-Na-Ayudhya, C.; Satayavivad, J.; Ruchirawat, S.; Prachayasittikul, V. 2008. Vasorelaxant and antioxidant activities of *Spilanthes acmella* Murr. *International Journal of Molecular Sciences*, 9: 2724–2744.

Wu, L.; Fan, N.; Lin, M.; Chu, I.; Huang, S.; Hu, C.; Han, S.A. 2008. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. *J. Agric. Food Chem.*, 56: 2341–2349.

Yao, L.H.; Jiang, Y.M.; Shi, J.; Tomas-Barberan, F.A.; Datta, N.; Singanusong, R.; Chen, S.S. 2004. Flavonoids in food and their health benefits. *Plant Food and Human Nutrition*, 59: 113-122.

Yodanis, K.A.; Spencer, J.P.; Schroeter, H.; Rice-Evans, C. 2002. Dietary flavonoids as potential neuroprotectants. *Biol Chem.*, 383(3-4): 503-519.

METABÓLITO	ELUENTE	REVELADOR	PADRÃO
Cumarina 1,2-benzopirona	Tolueno éter	KOH 5% UV 365nm	Padrão 1,2 benzopirona
Cumarina glicosídea	Polar ácido : AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O	KOH 5% UV 365nm	Padrão esculina
Terpenóides e ácido graxo	Hex: AcOEt : Acform.	Vanilina sulfúrica	Padrão Timol
Terpenóides e ácido graxo	Polar ácido :AcOEt: Acform.: HAc: H ₂ O	Vanilina sulfúrica	Padrão Timol
Flavonóides	Polar ácido ou ButOH: HAc: H ₂ O	M P e M Peg	Padrão Flavonoico
Taninos hidrolisáveis e flavonóides	ButOH: HAc: H ₂ O	Cloreto férrico 1%	Padrão Chá verde
Taninos condensados e flavonóides	ButOH: HAc: H ₂ O	Vanilina clorídrica 1%	Padrão Chá verde

Tabela 1. Condições cromatográficas utilizadas para caracterização fitoquímica do extrato aquoso das flores de *A. oleracea*. AcOEt= acetato de etila; Acform=ácido fórmico; Hex= hexano; ButOH=n-butanol; HAc: ácido acético; KOH=hidróxido de potássio.

Metabólitos secundários	Extrato aquoso das flores
Cumarinas	+
Ácidos graxos	-
Flavonóides	+
Taninos	-

Tabela 2. Triagem fitoquímica do extrato aquoso das flores de *A. oleracea*. (+) = positivo e (-) = negativo.

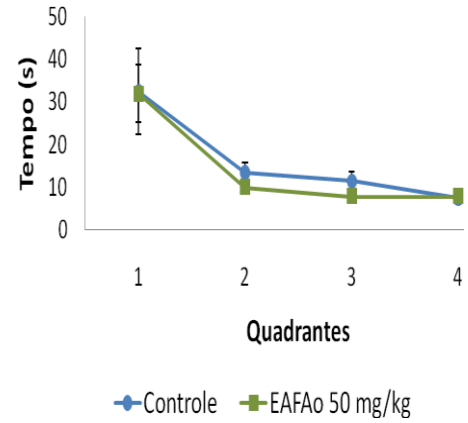
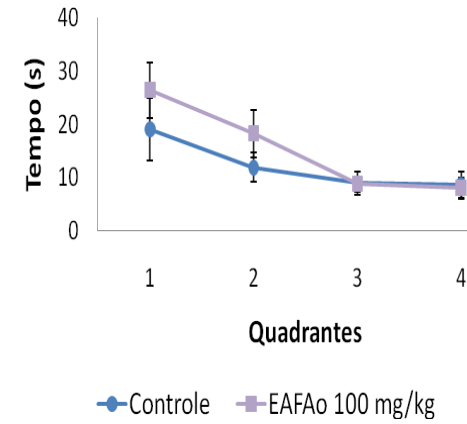
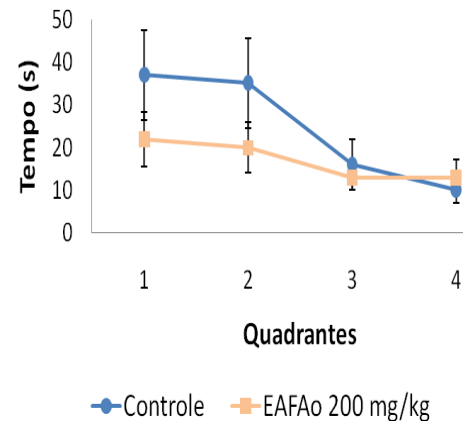
A**B****C**

Figura 1. Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Labirinto Aquático de Morris. Os valores representam a média \pm e.p.m., n=9 animais por grupo. (ANOVA seguida do teste t-Student).

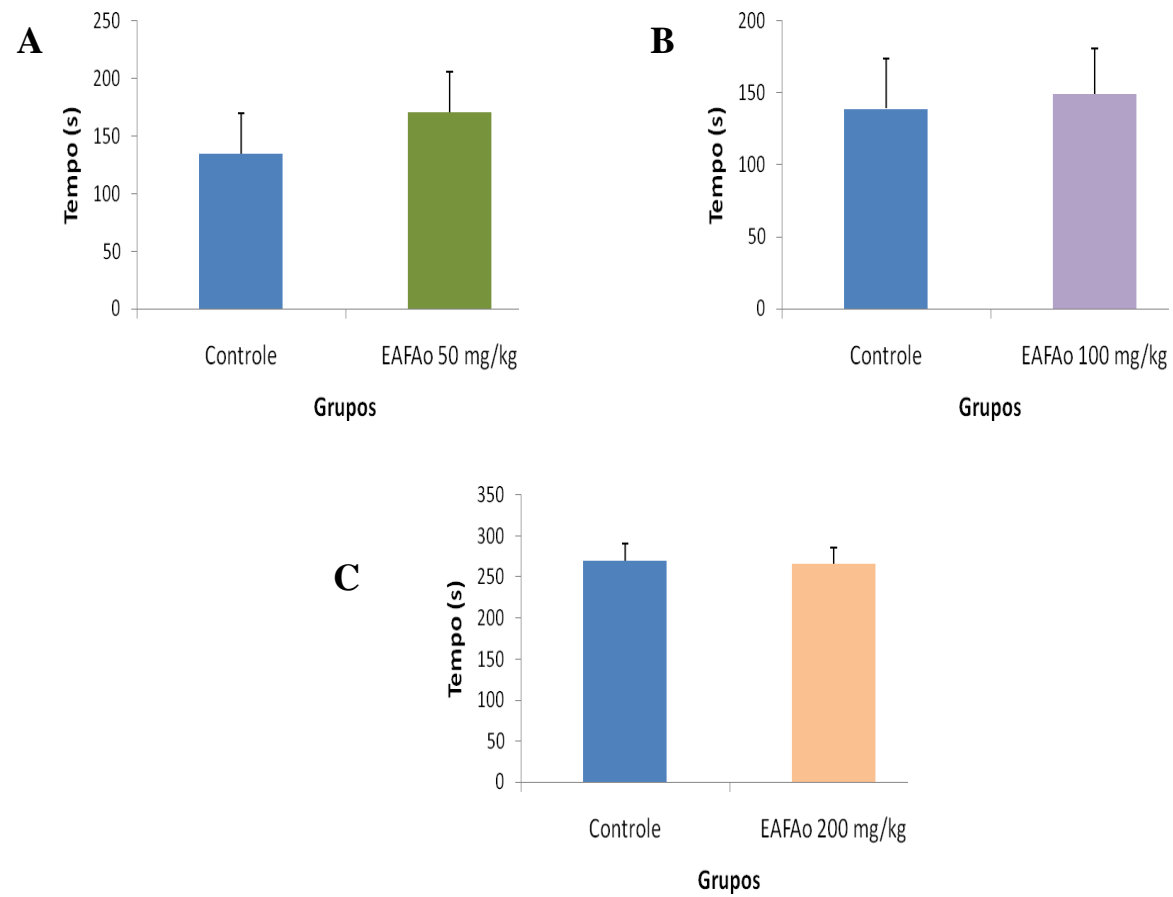


Figura 2. Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) na Caixa claro-escuro. Os valores representam a média \pm e.p.m., n=9 animais por grupo. (ANOVA seguida do teste t-Student).

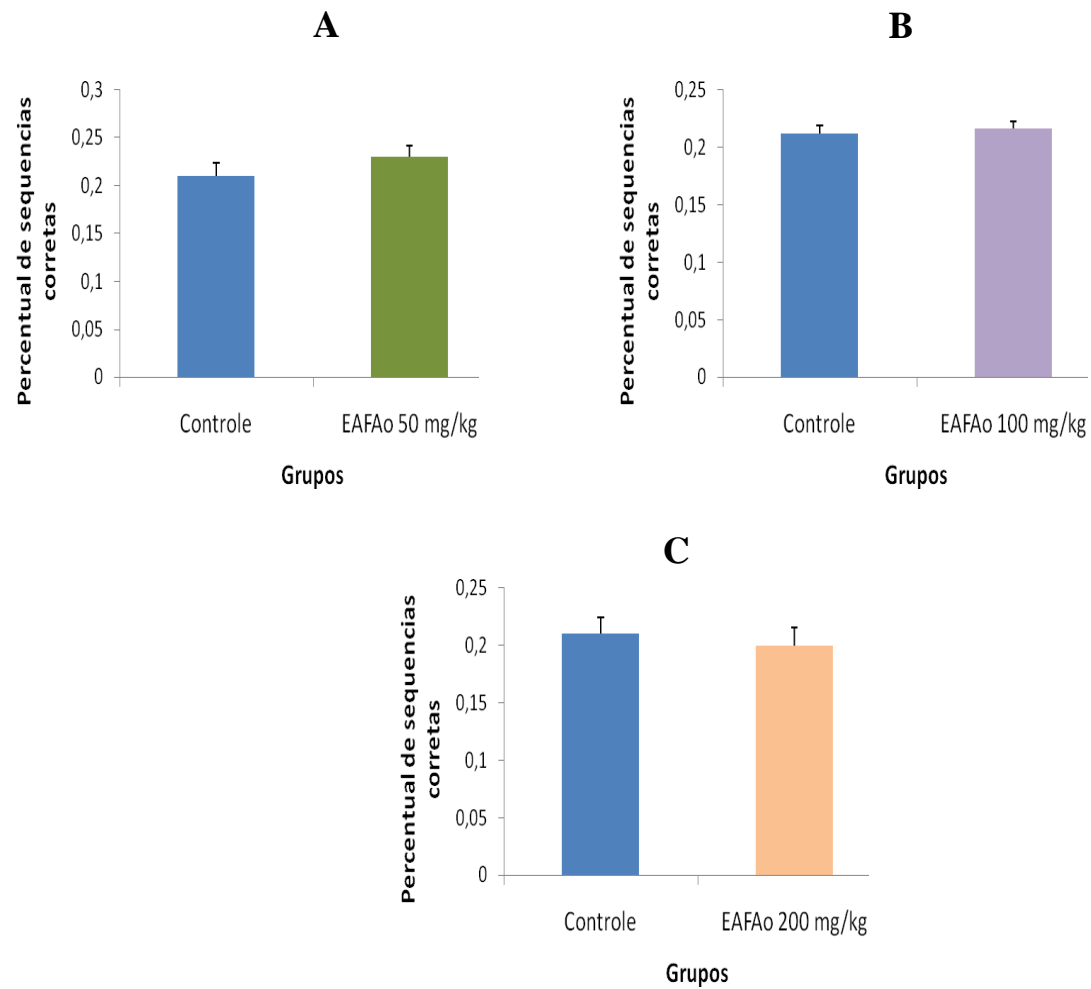


Figura 3 - Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Labirinto em Y. Os valores representam a média ± e.p.m., n=9 animais por grupo, (ANOVA seguida do teste t-Student).

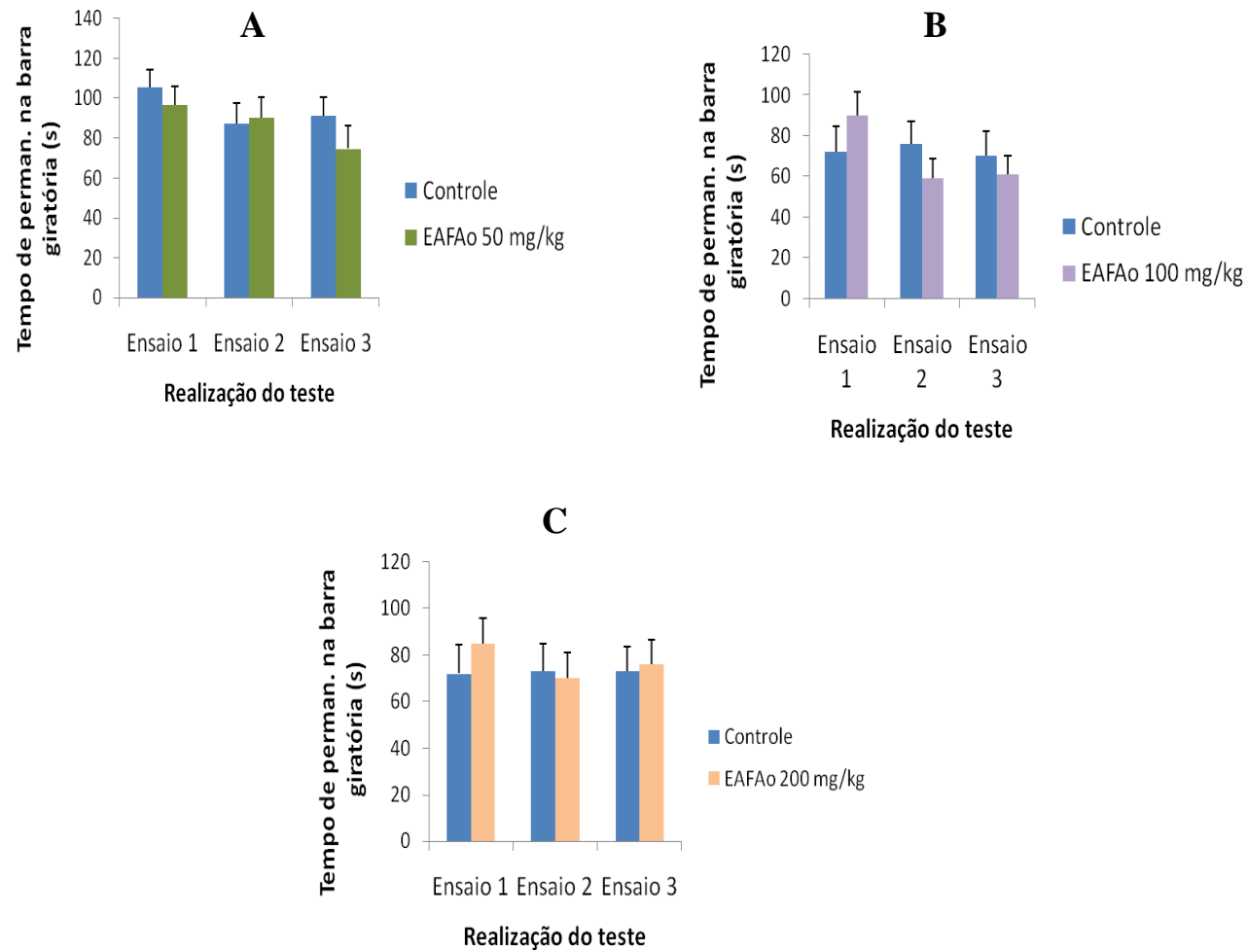


Figura 4 - Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50mg/kg (A), 100mg/kg (B) e 200 mg/kg (C) no Rota-rod. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=9), (ANOVA seguida do teste t-Student).

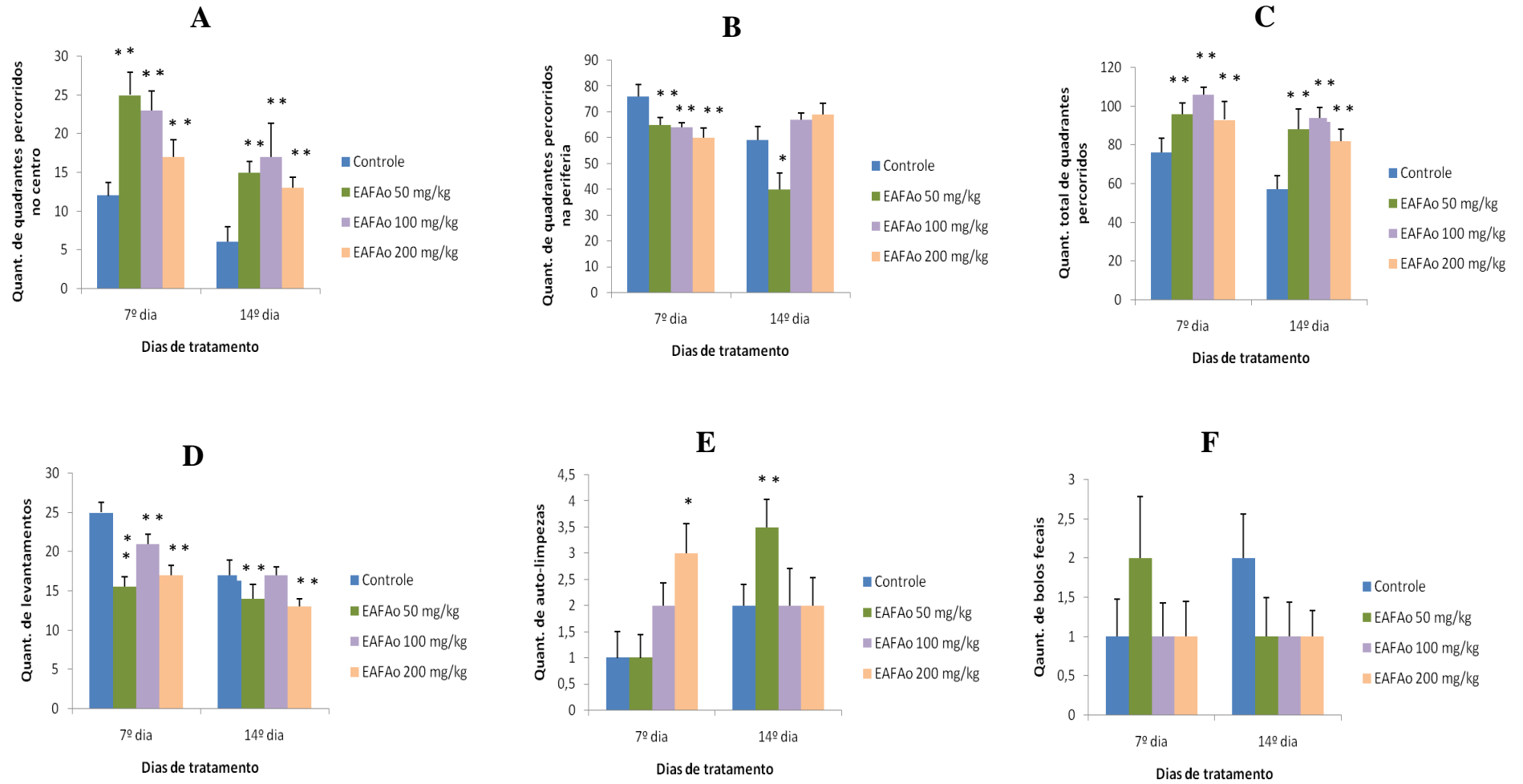


Figura 5 - Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50, 100 e 200 mg/kg no Campo aberto sobre QQPC (A), QQPP (B), QTQP (C), QL (D), QAL (E) e QBF (F). Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=7 animais por grupo), *p < 0,05; **p < 0,01 quando comparado ao controle (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

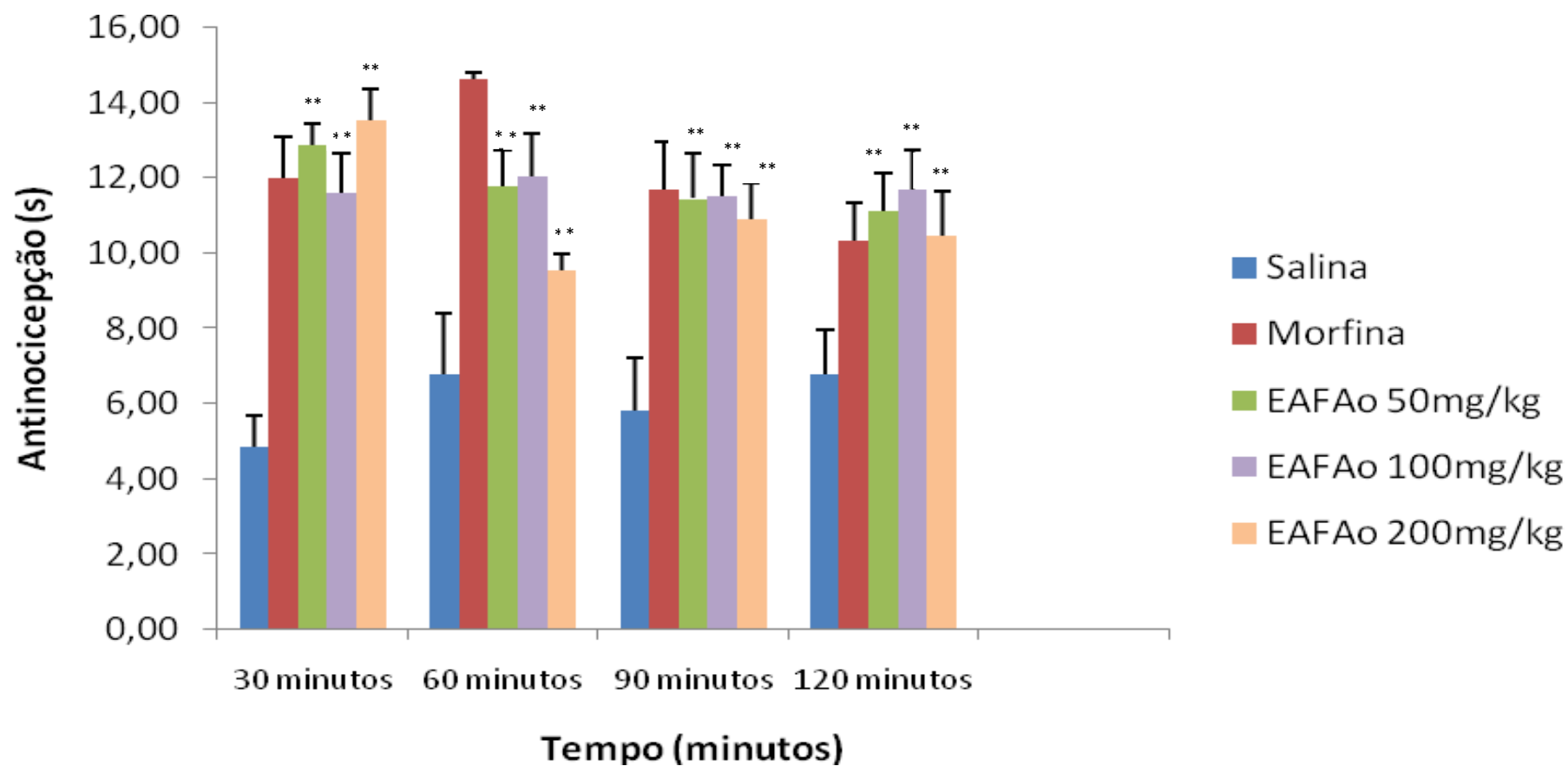


Figura 6. Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50, 100 e 200 mg/kg nos diferentes tempos de retirada da cauda de ratos após estímulo da resistência térmica, no teste de retirada da cauda “tail flick”. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=7 animais por grupo), *p < 0,05; **p < 0,01 quando comparado ao controle negativo (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

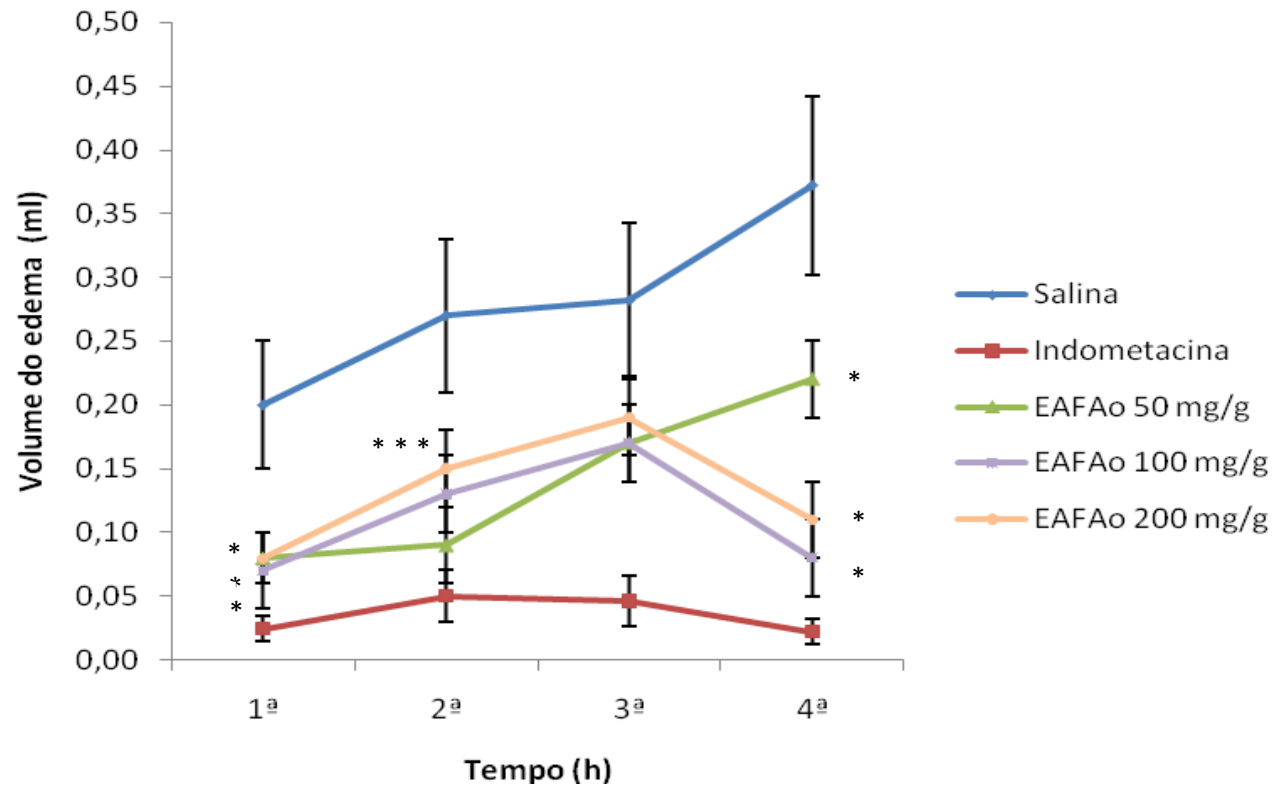


Figura 7. Efeito da administração do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* 50, 100 e 200 mg/kg na variação do edema de pata induzido por carragenina 1%. Os valores representam a média \pm e.p.m. (n=7 animais por grupo), *p < 0,05 quando comparado ao controle negativo (ANOVA seguida do teste de Dunnett).

5 SÍNTESE INTEGRADORA

Pesquisas sobre os possíveis efeitos farmacológicos e toxicológicos de plantas utilizadas na medicina tradicional no tratamento de diversas doenças propiciam a avaliação de aspectos importantes, como a eficácia e segurança do uso destas plantas para a saúde da população. Esta pesquisa, através dos resultados obtidos, contribuirá para uma melhor compreensão dos efeitos tóxicos e farmacológicos de uma espécie típica da região norte do Brasil (*Acmella oleracea* (L.) R.K. Jansen).

Nossos resultados nos testes farmacológicos corroboraram com pesquisas já realizadas com o Jambú em outras regiões do Brasil e do mundo, demonstrando que a espécie encontrada na região Oeste do Pará também possuiu uma ação analgésica e antiinflamatória, confirmando ações citadas pela população para o uso desta espécie. Na avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato aquoso das flores de *A. oleracea* embora nenhuma alteração tenha sido observada nos testes comportamentais envolvendo ratos, devemos ressaltar que uma ação ansiolítica foi detectada no teste de campo aberto com camundongos, demonstrando a importância da continuidade desta pesquisa para uma melhor avaliação de possíveis efeitos tóxicos da planta em estudo.

Assim, os resultados contidos nesta dissertação têm relevância na medida em que poderão servir como base para futuras pesquisas, contribuindo assim para elucidação da eficácia e segurança no uso medicinal de *Acmella oleracea* (L.) R.K.Jansen na Amazônia.

ANEXOS

ANEXO A: Normas da Revista Acta Amazonica.

ANEXO B: Autorização comitê de ética para uso de animais.

INSTRUÇÕES AOS AUTORES

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores devem verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. Submissões que não estejam de acordo com as normas são devolvidas aos autores.

1. O tamanho máximo do arquivo deve ser 3 MB.
2. O manuscrito deve ser acompanhado de uma carta de submissão indicando que: a) os dados contidos no trabalho são originais e precisos; b) que todos os autores participaram do trabalho de forma substancial e estão preparados para assumir responsabilidade pública pelo seu conteúdo; c) a contribuição apresentada à Revista não foi previamente publicada e nem está em processo de publicação, no todo ou em parte em outro veículo de divulgação. A carta de submissão deve ser carregada no sistema da Acta Amazonica como "documento suplementar".
3. Os manuscritos são aceitos em português, espanhol e inglês, mas encorajam-se contribuições em inglês. A veracidade das informações contidas numa submissão é de responsabilidade exclusiva dos autores.
4. A extensão máxima para artigos e revisões é de 30 páginas (ou 7500 palavras, excluindo a primeira página, ver item 8) incluindo bibliografia, tabelas, figuras e legendas, dez páginas (2500 palavras) para comunicações e notas científicas e cinco páginas para outros tipos de contribuições. Tabelas e figuras devem ser inseridas ao final do texto, nesta ordem. Uma cópia das figuras deve ser submetida em formato eletrônico na página do Periódico (ver itens 24-31).
5. Os manuscritos formatados conforme as Normas da Revista (Instruções para os autores) são enviados aos editores associados para pré-avaliação. Neste primeiro julgamento são levados em consideração a relevância científica, a inteligibilidade do manuscrito e o escopo no contexto amazônico. Nesta fase, contribuições fora do escopo ou de pouca relevância científica são rejeitadas. Manuscritos aprovados na pré-

avaliação são enviados para revisores (pelo menos dois), especialistas de outras instituições diferentes daquelas dos autores, para uma análise mais detalhada.

6. Uma contribuição pode ser considerada para publicação, se tiver recebido pelo menos dois pareceres favoráveis no processo de avaliação. A aprovação dos manuscritos está fundamentada no conteúdo científico e na sua apresentação conforme as Normas da Revista.

7. Os manuscritos que necessitam correções são encaminhados aos autores para revisão. A versão corrigida deve ser encaminhada ao Editor no prazo de DUAS semanas. Uma carta de encaminhamento deve ser carregada no sistema da Revista, detalhando as correções efetuadas. Nessa carta, recomendações não incorporadas ao manuscrito devem ser explicadas. Todo o processo de avaliação pode ser acompanhado no endereço, <http://submission.scielo.br/index.php/aa/login>.

8. A organização do manuscrito deve seguir esta ordem, na primeira página: Título, nome(s) e endereço institucional e eletrônico do(s) autor(es). Nas páginas seguintes: Título, Resumo, Palavras-Chave, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão e Conclusões, Agradecimentos (incluído apoio financeiro), Bibliografia Citada e finalmente, tabelas e figuras com as suas respectivas legendas.

Importante: Toda submissão deve incluir antes da Introdução: título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês.

9. As comunicações e notas científicas são redigidas separando os tópicos (Introdução, etc) em parágrafos, mas sem incluir os seus respectivos títulos. Estas contribuições, como no caso do artigo completo, também devem conter: Título, nome(s) e endereço institucional e eletrônico do(s) autor(es), Resumo, Palavras Chave e os tópicos do artigo completo incluindo título, abstract e palavras-chave (keywords) em inglês. São permitidas até três figuras e duas tabelas.

10. O(s) nome(s) completo(s) do(s) autor(es) deve(m) ser escrito(s) com o último nome em letras maiúsculas. Nomes e instituição(ões) com o endereço completo, incluindo telefone, fax, e-mail devem ser cadastrados no sistema da Revista no ato da submissão.

11. **IMPORTANTE:** Os manuscritos não formatados conforme as Normas da Revista **NÃO** são aceitos para publicação.

12. Os manuscritos devem ser preparados usando editor de texto (e salvos em formato doc, docx ou rtf), utilizando fonte "Times New Roman", tamanho 12 pt, espaçamento duplo, com margens de 3 cm. As páginas e as linhas devem ser numeradas de forma contínua.

13. O título deve ser justificado à esquerda; com a primeira letra maiúscula.

14. O resumo, com até 250 palavras ou até 150 palavras no caso de notas e comunicações, deve conter de forma sucinta, o objetivo, a metodologia; os resultados e as conclusões. Os nomes científicos das espécies e demais termos em latim devem ser escritos em itálico.

15. As palavras-chave devem ser em número de três a cinco. Cada palavra-chave pode conter dois ou mais termos. Porém, não repetir palavras utilizadas no título.

16. **Introdução.** Esta seção deve enfatizar o propósito do trabalho e fornecer de forma sucinta o estado do conhecimento sobre o tema em estudo. Nesta seção devem-se especificar claramente os objetivos ou hipóteses a serem testados. Não incluir resultados ou conclusões na Introdução.

17. **Material e Métodos.** Esta seção deve ser organizada cronologicamente e explicar os procedimentos realizados, de tal modo que outros pesquisadores possam repetir o estudo. O procedimento estatístico utilizado deve ser descrito nesta seção. Procedimentos-padrão devem ser apenas referenciados. As unidades de medidas e as suas abreviações devem seguir o Sistema Internacional e, quando necessário, deve constar uma lista com as abreviaturas utilizadas. Equipamento específico utilizado no estudo deve ser descrito (modelo, fabricante, cidade e país de fabricação). Material testemunho (amostra para referência futura) deve ser depositado em uma ou mais coleções científicas e informado no manuscrito.

18. **Aspectos éticos e legais.** Para estudos que exigem autorizações especiais (p.exe. Comitê de Ética/Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP, IBAMA, CNTBio,

INCRA/FUNAI, EIA/RIMA, outros) deve-se informar o número do protocolo de aprovação.

19. Resultados. Os resultados devem apresentar os dados obtidos com o mínimo julgamento pessoal. Não repetir no texto toda a informação contida em tabelas e figuras. Algarismos devem estar separados de unidades. Por exe., 60 °C e NÃO 60° C, exceto para percentagem (p. exe., 5% e NÃO 5 %). Utilizar unidades e símbolos do sistema internacional e simbologia exponencial. Por exe., cmol kg^{-1} em vez de meq/100g.

20. Discussão e Conclusões. A discussão deve ter como alvo os resultados obtidos. Evitar mera especulação. Entretanto, hipóteses bem fundamentadas podem ser incorporadas. Apenas referências relevantes devem ser incluídas. As conclusões devem conter uma interpretação sucinta dos resultados e uma mensagem final que destaque as implicações científicas do trabalho. As conclusões podem ser apresentadas como um tópico separado ou incluídas como parte da seção Discussão.

21. Agradecimentos (incluindo apoio financeiro). Devem ser breves e concisos.

22. Bibliografia citada. Pelo menos 70% das referências devem ser artigos de periódicos científicos. As referências devem ser preferencialmente dos últimos 10 anos e de preferência não exceder o número de 40. Os nomes dos autores devem ser citados em ordem alfabética. As referências devem se restringir a citações que aparecem no texto. Nesta seção, o título do periódico NÃO deve ser abreviado.

a) Artigos de periódicos:

Walker, I. 2009. Omnivory and resource - sharing in nutrient - deficient Rio Negro waters: Stabilization of biodiversity? *Acta Amazonica*, 39: 617-626.

Alvarenga, L.D.P.; Lisboa, R.C.L. 2009. Contribuição para o conhecimento da taxonomia, ecologia e fitogeografia de briófitas da Amazônia Oriental. *Acta Amazonica*, 39: 495-504.

b) Dissertações e teses:

Ribeiro, M.C.L.B. 1983. As migrações dos jaraquis (Pisces: Prochilodontidae) no rio Negro, Amazonas, Brasil. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Fundação Universidade do Amazonas, Manaus, Amazonas. 192p.

c) Livros:

Steel, R.G.D.; Torrie, J.H. 1980. Principles and procedures of statistics: a biometrical approach. 2da ed. McGraw-Hill, New York, 1980, 633p.

d) Capítulos de livros:

Absy, M.L. 1993. Mudanças da vegetação e clima da Amazônia durante o Quaternário. In: Ferreira, E.J.G.; Santos, G.M.; Leão, E.L.M.; Oliveira, L.A. (Ed.). Bases científicas para estratégias de preservação e desenvolvimento da Amazônia. v.2. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, p.3-10.

e) Citação de fonte eletrônica:

CPTEC, 1999. Climanalise, 14: 1-2 (www.cptec.inpe.br/products/climanalise). Acesso em 19/05/1999.

23. No texto, citações de referências seguem a ordem cronológica. Para duas ou mais referências do mesmo ano citar conforme a ordem alfabética. Exemplos:

a) Um autor:

Pereira (1995) ou (Pereira 1995).

b) Dois autores:

Oliveira e Souza (2003) ou (Oliveira e Souza 2003).

c) Três ou mais autores:

Rezende et al. (2002) ou (Rezende et al. 2002).

d) Citações de anos diferentes (ordem cronológica):

Silva (1991), Castro (1998) e Alves (2010) ou (Silva 1991; Castro 1998; Alves 2010).

e) Citações no mesmo ano (ordem alfabética):

Ferreira et al. (2001) e Fonseca et al. (2001); ou (Ferreira et al. 2001; Fonseca et al. 2001).

FIGURAS

24. Fotografias, desenhos e gráficos devem ser de alta resolução, em preto e branco com alto contraste, numerados sequencialmente em algarismos arábicos. A legenda da figura deve estar em posição inferior a esta. NÃO usar tonalidades de cinza em gráfico dispersão (linhas ou símbolos) ou gráficos de barra. Em gráfico de dispersão usar símbolos abertos ou sólidos (círculos, quadrados, triângulos, ou losangos) e linhas em preto (contínuas, pontilhadas ou tracejadas). Para gráfico de barra, usar barras pretas, bordas pretas, barras listradas ou pontilhadas. Na borda da área de plotagem utilizar uma linha contínua e fina, porém NÃO usar uma linha de borda na área do gráfico. Evitar legendas desnecessárias na área de plotagem. Nas figuras, NÃO usar letras muito pequenas (< tamanho 10 pt), nos títulos dos eixos ou na área de plotagem. Nos eixos (verticais, horizontais) usar marcas de escala internas. NÃO usar linhas de grade horizontais ou verticais, exceto em mapas ou ilustrações similares. O significado das siglas utilizadas deve ser descrito na legenda da figura.

25. O número máximo de figuras é de sete em artigos e de três em comunicações e notas científicas e devem ser de alta qualidade.

26. As figuras devem estar dimensionadas de forma compatível com as dimensões da Revista, ou seja, largura de uma coluna (8 cm) ou de uma página 17 cm e permitir espaço para a legenda. As ilustrações podem ser redimensionadas durante o processo de produção para otimizar o espaço da Revista. Na figura, quando for o caso, a escala deve ser indicada por uma linha ou barra (horizontal) e, se necessário, referenciadas na legenda da figura, por exemplo, barra = 1 mm.

27. No texto, a citação das figuras deve ser com letra inicial maiúscula, na forma direta ou indireta (entre parêntesis). Por exe.: Figura 1 ou (Figura 1). Na legenda, a figura deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe.: "Figura 1. Análise..."

28. Para figuras não originais ou publicadas anteriormente, os autores devem informar explicitamente no manuscrito que a permissão para reprodução foi concedida e carregar no sistema da Revista, como documento suplementar, o comprovante outorgado pelo detentor dos direitos autorais.

29. Fotografias e ilustrações (Bitmap) devem estar no formato tiff ou jpeg, em alta resolução (mínimo de 300 dpi). Em gráficos de dispersão ou de barras utilizar o formato xls, xlsx, eps, cdr ou ai. Cada uma das figuras inseridas no texto deve também ser carregada no sistema da Acta Amazonica em arquivo separado, como um "documento suplementar".

30. Fotografias devem estar, preferencialmente, em preto e branco. Fotografias coloridas podem ser aceitas, mas o custo de impressão é por conta dos autores. Como alternativa, pode ser usada figura em preto e branco na versão impressa e colorida (se for necessário) na versão eletrônica, sem custo para os autores.

31. Os autores podem ser convidados a enviar uma fotografia colorida, para ilustrar a capa da Revista. Nesse caso, não há custos para os autores.

TABELAS

32. As tabelas devem ser organizadas e numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. O número máximo de tabelas é de cinco para os artigos e de duas para as comunicações e notas científicas. A numeração e o título (autoexplicativo) devem estar em posição superior à tabela. A tabela pode ter notas de rodapé. O significado das siglas utilizadas na tabela (cabeçalhos, etc) deve ser descrito no título.

33. As tabelas devem ser elaboradas em editor de texto (extensão rtf, doc ou docx) e não devem ser inseridas no texto como figura (p. exe. no formato jpeg).

34. A citação no texto pode ser na forma direta ou indireta (entre parêntesis), por extenso, com a letra inicial maiúscula. Por exe. Tabela 1 ou (Tabela 1). Na legenda, a tabela deve ser numerada seguida de ponto antes do título. Por exe. "Tabela 1. Análise...".

INFORMAÇÕES ADICIONAIS

1. A Acta Amazonica pode efetuar alterações de formatação e correções gramaticais no manuscrito para ajustá-lo ao padrão editorial e linguístico. As provas finais são enviadas aos autores para a verificação. Nesta fase, apenas os erros tipográficos e ortográficos podem ser corrigidos. Nessa etapa, NENHUMA alteração de conteúdo pode ser feita no manuscrito, se isso acontecer, o manuscrito pode retornar ao processo de avaliação.

2. A Acta Amazonica não cobra taxas para publicação. Informações adicionais podem ser obtidas por e-mail acta@inpa.gov.br. Para informações sobre um determinado manuscrito, deve-se fornecer o número de submissão.

3. As assinaturas da Acta Amazonica podem ser pagas com cheque ou vale postal. Para o exterior, a assinatura institucional custa US\$ 100,00 e a assinatura individual US\$ 75,00. Para contato: valda@inpa.gov.br. Tel.: (55 92) 3643-3643 ou fax: (55 92) 3643-3029.



GOVERNO DO ESTADO DO PARÁ
UNIVERSIDADE DO ESTADO DO PARÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO ANIMAIS

Protocolo N° 12/12

Título do Projeto de Pesquisa: **Atividade farmacológica e toxicológica das flores de *Splianthes oleracea* L.**

Pesquisador Responsável: **Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira.**

Instituição: **Universidade Federal do Oeste do Pará.**

Data do Parecer: 26/04/12.

PARECER

O Comitê de Ética no Uso de Animais da UEPA apreciou o protocolo em tela e, verificou que foram atendidas todas as exigências da Lei Federal 11.794, sendo respeitados os Princípios Éticos da Experimentação Animal do COBEA. Portanto, manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO**

LIBERADO para o início da pesquisa sendo obrigatório a entrega neste CEUA do relatório semestral e de conclusão ao final da pesquisa. Comunicar por escrito, toda e qualquer modificação no projeto.

Belém, 04 de maio de 2012.



Rosa Helena de F. Chaves
MÉDICA VETERINÁRIA
CRMV/PA 2º29

M.V. Esp. ROSA HELENA DE FIGUEIREDO CHAVES
VICE-COORDENADORA DO CEUA/UEPA