



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

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA,
ANTINOCICEPTIVA E TOXICOLÓGICA DE *Myrcia amazonica*
DC. (Myrtaceae)**

POLIANE SILVA LOPES

Santarém, PA
Dezembro, 2017

POLIANE SILVA LOPES

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA,
ANTINOCICEPTIVA E TOXICIDADE DE *Myrcia amazonica* DC.
(Myrtaceae)**

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 Ciências Ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia.

Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos

Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia..

Santarém, PA

Dezembro, 2017

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

L864a Lopes, Poliane Silva

Avaliação da atividade antiedematogênica, antinociceptiva e toxicidade de *Myrcia amazonica* D.C. (Myrtaceae)/ Poliane Silva Lopes. – Santarém, 2019.

53 p. : il.

Inclui bibliografias.

Orientador: Ricardo Bezerra de Oliveira

Coorientadora: Rosa Helena Veras Mourão

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Oeste do Pará, Pró-Reitoria de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação Tecnológica, Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia.

1. Pedra-ume-caá. 2. Edema de pata. 3. Contorções abdominais. I. Oliveira, Ricardo Bezerra de, *orient.* II. Mourão, Rosa Helena Veras, *coorient.* III. Título.

CDD: 23 ed. 581.6



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

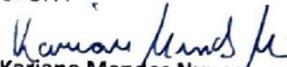
ATA DA SESSÃO DE DEFESA DA 108ª
 DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-
 GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA
 AMAZÔNIA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO
 OESTE DO PARÁ, CANDIDATA POLIANE SILVA
 LOPES.

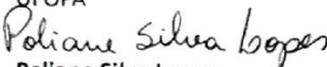
1 Aos 06 (seis) dias do mês de dezembro de 2017 (dois mil e dezessete), às 11h00, na sala 04
 2 do prédio da PROPPIT - UFOPA, realizou-se a sessão de defesa pública da dissertação ao
 3 grau de mestre em Ciências Ambientais – área de concentração Estudos e Manejos de
 4 Ecossistemas Amazônicos, de autoria de Poliane Silva Lopes, intitulada “AVALIAÇÃO DA
 5 ATIVIDADE ANTIEDEMATOGÊNICA, ANTINOCICEPTIVA E TOXICOLÓGICA DE *Myrcia*
 6 *amazonica* DC. (Myrtaceae)”. A Banca Examinadora constituiu-se dos professores doutores:
 7 Adriana Caroprezo Morini – UFOPA; Maxwell Barbosa de Santana – UFOPA; Kariane Mendes
 8 Nunes - UFOPA. De acordo com o Regimento Interno do Curso, o Presidente da Banca
 9 constituído pelo Prof. Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira abriu a sessão, passando a palavra
 10 para a mestranda, que fez a exposição do seu trabalho. Findada a arguição, a banca
 11 examinadora se reuniu, sem a presença da candidata e do público, tendo deliberado por
 12 unanimidade pela sua **aprovação**, condicionada às correções sugeridas pela Banca
 13 Examinadora. Nada mais havendo por constar, lavrou-se e fez-se a leitura da presente ata
 14 que segue assinada pelos membros da Banca Examinadora, Presidente (orientador) e
 15 mestranda. Santarém-PA. **06 de dezembro de 2017.**


Ricardo Bezerra de Oliveira
 (Orientador – Presidente)


Adriana Caroprezo Morini
 UFOPA


Maxwell Barbosa de Santana
 UFOPA


Kariane Mendes Nunes
 UFOPA


Poliane Silva Lopes
 (Mestranda)

DEDICATÓRIA

À Deus e minha família.

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por estar presente em todos os momentos da minha vida, me dando forças, confiança e direcionamento para vencer os desafios e concluir mais esta etapa.

Aos meus orientadores, **Dr. Ricardo Bezerra de Oliveira e Dra. Rosa Helena Veras Mourão**, por todos os ensinamentos, pela paciência, apoio e orientação durante a realização deste trabalho.

À **minha família** por todo apoio e incentivo que foram essenciais ao longo deste caminho. À **UFOPA, PPGRNA, CAPES e CNPq** pelo apoio financeiro. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Aos amigos e parceiros do Laboratório de Bioprospeção e Biologia Experimental (LabBBEx), em especial a **Sandra Sarrazin, Adrielle Serra, Wânia Cristina, Leomara Andrade, Ana Paula Assunção, Juliana Raposo, Thuanny Castro, Juliana Almeida**. Obrigada pela amizade e pela disposição em ajudar um ao outro.

À **Amanda Azevedo e Meive Freire**, pela amizade e por serem minhas parceiras fiéis e dedicadas durante a realização deste trabalho e principalmente durante os testes biológicos.

A todos os amigos da turma PGRNA 2014. Obrigada pela amizade, pelo apoio dado nos momentos difíceis, pelos conhecimentos compartilhados.

À **Universidade Federal do Oeste do Pará** e ao **Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia** pela oportunidade e investimento.

À todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!

EPÍGRAFE

“Tenho a impressão de ter sido uma criança brincando à beira-mar, divertindo-me em descobrir uma pedrinha mais lisa ou uma concha mais bonita que as outras, enquanto o imenso oceano da verdade continua misterioso diante de meus olhos”. (Isaac Newton)

LOPES, Poliane Silva. Avaliação Antiedematogênica, Antinociceptiva e Toxicológica de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae), 2017. 50 páginas. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2017.

RESUMO

As plantas medicinais são consideradas de grande importância para obtenção de moléculas bioativas e para a descoberta de novos fármacos, sendo necessária a realização de pesquisas que avaliem os seus efeitos farmacológicos e toxicológicos. *Myrcia amazonica* DC é conhecida popularmente como “pedra-ume-caá” na região norte do Brasil. Esta é utilizada pela população para o tratamento de várias patologias, como doenças de origem inflamatória, diabetes e diarreia. Apesar de ser utilizada e comercializada em mercados e feiras como planta medicinal, não há pesquisas publicadas a respeito de suas reais propriedades farmacológicas e toxicológicas, sendo que tais estudos são essenciais para garantir a eficácia e segurança de plantas utilizadas tradicionalmente como medicinais. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades antiedematogênica e antinociceptiva do extrato hidroalcolico das folhas de *M. amazonica* (EHAMa) nas doses de 360, 480 e 600mg/kg, além de investigar seus possíveis efeitos neurotóxicos e hepatotóxicos. A atividade antiedematogênica foi avaliada por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina em ratos wistar e a atividade antinociceptiva, pelo teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundondos swiss. Os possíveis efeitos neurotóxicos do tratamento agudo e subcrônico foram investigados por meio dos testes comportamentais: labirinto aquático de Morris e barra giratória. A avaliação da hepatotoxicidade foi realizada por meio da determinação quantitativa dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT). Os resultados obtidos mostraram que o EHAMA, administração aguda (a.a.), inibiu significativamente o edema de pata induzido por carragenina na dose de 600 mg/kg em 67%, em comparação com o grupo controle, demonstrando que o mesmo tem potencial como agente anti-inflamatório. O EHAMA (a.a.) apresentou efeito antinociceptivo nas doses de 360, 480 e 600 mg/kg reduzindo significativamente o número de contorções abdominais em 42, 40 e 97% respectivamente. O tratamento, tanto agudo quanto subcrônico, com o EHAMA na dose de 600mg/kg, não provocou alterações significativas sobre a locomoção, memória e aprendizagem de ratos Wistar. Os resultados encontrados para os níveis das enzimas ALT e AST no soro de ratos mostraram que o tratamento por 21 dias com o EHAMA na dose de 600 mg/kg, teve diferença significativa quando comparado ao grupo controle, no sentido de diminuir os níveis dessas enzimas em 23% para AST e 42% para ALT, pode-se assim sugerir um possível efeito hepatoprotetor bem como a ausência de efeitos hepatotóxicos. Esses resultados indicam um potencial farmacológico do EHAMA, o que justifica em parte o uso desta espécie pela população. No entanto, são necessários novos estudos para conhecimento dos princípios ativos da espécie e dos seus possíveis mecanismos de ação.

Palavras-Chave: Pedra-ume-caá, edema de pata, contorções abdominais, hepatotoxicidade, neurotoxicidade.

LOPES, Poliane Silva. Antiedematogenic, antinociceptive and toxicologic avaliation of *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae), 2017. 50 pages. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará- UFOPA, Santarém, 2017.

ABSTRACT

Medicinal plants are considered great importance for obtaining bioactive molecules and for drug discovery, and it is essential to perform researches to assess their pharmacological and toxicological effects. *Myrcia amazonica* DC is popularly known as “pedra-ume-caá” in northern Brazil. It is used by the population for the treatment of various diseases such as diseases of inflammatory origin, diabetes and diarrhea. Although being used and sold in markets and fairs as a medicinal plant, there are no published researches about its real pharmacological and toxicological properties, and such studies are essential to ensure the efficacy and safety of plants traditionally used as medicinal. Thus, the aim of this study was to evaluate the antiedematogenic and antinociceptive activities of hydroalcoholic extract of *M. amazonica* leaves (EHAMa) at doses of 360, 480 and 600mg/kg, and to investigate its potential neurotoxic and hepatotoxic effects. The antiedematogenic activity was evaluated using the paw edema test induced by carrageenin and nociceptive activity by the writhing test induced by acetic acid. The possible neurotoxic effects of acute and subchronic treatment were investigated through the behavioral tests: the Morris water maze and rotating bar. The evaluation of hepatotoxicity was performed by quantitative determination of serum aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT). The results showed that the EHAMA acute administration (a.a.), significantly inhibited the paw edema induced by carrageenan at 600 mg / kg in 67%, compared with the control group, demonstrating that it has potential as an anti-inflammatory agent. The EHAMA (a.a.) showed analgesic effect in the doses 360, 480 and 600 mg/kg significantly reducing the number of writhes by 42, 40 and 97% respectively. The treatment, both acute and subchronic, with EHAMA at a dose of 600 mg / kg did not cause significant alterations on locomotion, memory and learning Wistar rats. The results for the levels of ALT and AST enzymes in the serum of mice have shown that the treatment for 21 days with EHAMA at a dose of 600 mg / kg had significant difference compared with the control group, in order to reduce the levels of these enzymes in 23% for AST and 42% for ALT, can thus suggesting a possible effect hepatoprotective well as the absence of hepatotoxic effects. These results indicate a pharmacological potential of EHAMA, which explains in part the use of this specie by the population. However, further studies are needed to know the active ingredients of the specie and its possible mechanisms of action.

Key-words: Pedra-ume-caá, paw edema test, writhing test, hepatotoxicity, neurotoxicity.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	xii
1. INTRODUÇÃO GERAL	14
1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
1.1.1 Plantas Medicinais	15
1.1.2 Família Myrtaceae	16
1.1.3 Nocicepção	18
1.1.4 Inflamação	20
1.1.5 Toxicidade de Plantas Medicinais	21
1.1.5.1 Hepatotoxicidade.....	22
1.1.5.2 Neurotoxicidade	22
1.2 OBJETIVOS	23
1.2.1 Objetivo Geral	23
1.2.2 Objetivos Específicos	24
2 MATERIAL E MÉTODOS	24
2.1 Seleção, Coleta e Obtenção do Material Botânico.....	24
2.2 Caracterização da Matéria Prima Vegetal... ..	25
2.2.1 Granulometria	25
2.2.2 Determinação do índice de intumescência	26
2.3 Obtenção do Extrato Hidroalcolico 65% de <i>Myrcia amazonica</i>	27
2.4 Estudos <i>In Vivo</i>	27
2.5 Testes Farmacológicos	28
2.5.1 Edema de Pata Induzido Por Carragenina	28
2.5.2 Contorção Abdominal Induzida Por Ácido Acético	28
2.6 Testes Toxicológicos	29
2.6.1 Teste do Labirinto Aquático de Morris	30
2.6.2 Teste da Barra Giratória	30
2.6.3 Hepatotoxicidade	30
2.7 Análise Estatística	32
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
3.1 Caracterização da Matéria Prima Vegetal	32
3.2 Testes Farmacológicos.....	33
3.2.1 Edema de Pata Induzido por Carragenina	33
3.2.2 Contorção abdominal induzida por ácido acético	34
3.3 Testes Toxicológicos	36

3.3.1 Análise do peso corporal	36
3.3.2 Teste do Labirinto Aquático de Morris	36
3.3.3 Teste de Rotação	38
3.3.4 Avaliação da Hepatotoxicidade.....	39
4 CONCLUSÃO	41
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – <i>Myrcia amazonia</i> D.C.	25
Figura 02 – Desenho esquemático do Labirinto Aquático de Morris.	30
Figura 03 – Aparelho rota-rod	31
Figura 04 – Efeito do EHAMa sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar	33
Figura 05 – Número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	35
Figura 06 – Alterações do peso corporal de ratos Wistar submetidos ao tratamento por 21 dias com o EHAMa	36
Figura 07 – Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) do EHAMa em ratos Wistar no teste do labirinto aquático de Morris	37
Figura 08 – Efeito da administração aguda do EHAMa no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória	38
Figura 09 – Efeito da administração subcrônica do EHAMa no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória	38

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Caracterização farmacopeica do Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>M. amazonica</i>	32
Tabela 02 – Níveis de enzima alanina aminotransferase (ALT) e asparto aminotransferase (AST) em soro de ratos Wistar.....	39

1. INTRODUÇÃO GERAL

A primeira fonte de fármacos na história da humanidade advém das plantas e, a partir de sua caracterização química, no século XIX, os compostos bioativos derivados de plantas têm impulsionado continuamente o desenvolvimento de novas drogas (FÜRST; ZÜNDORF, 2014).

A biodiversidade do Brasil é considerada uma fonte dessas substâncias bioativas e sua preservação é fundamental tanto pelo valor intrínseco dessa riqueza biológica como pelo seu potencial como fonte de novos fármacos (BARREIRO, 1999; COSTA, 2002). Apesar de o Brasil ter mais de 100 mil espécies de plantas catalogadas, a maior parte destas nunca teve sua ação terapêutica pesquisada cientificamente (CARVALHO, 2011; CARVALHO *et al.*, 2014).

Essa diversidade biológica vem sendo estudada sob alguns aspectos, ao longo de quase 60 anos de pesquisas multidisciplinares envolvendo químicos, biólogos e farmacologistas (USP, 2011). Apesar desse avanço, ainda é crescente a necessidade pela descoberta de novas substâncias com propriedades farmacológicas, notadamente antiinflamatórias e analgésicas, que sejam eficazes e com o mínimo de efeitos colaterais (CALIXTO *et al.*, 2000).

Outro aspecto relevante em pesquisas com plantas medicinais está relacionado com a avaliação de seus efeitos toxicológicos, pois a crença na “naturalidade inócua” dos recursos naturais expõe a população a riscos para a saúde, sendo necessário existir uma ampla linha de estudos de base toxicológica sobre uma espécie, antes do desenvolvimento de um novo medicamento (VENÂNCIO, 2006), uma vez que pesquisadores comprovaram que muitas espécies que são comumente utilizadas pela população apresentam efeitos tóxicos (HOSSEINZADEH; YOUNESI, 2002; ADEOYE; OYEDAPA, 2004).

As pesquisas com plantas medicinais são vistas como uma estratégia bastante promissora (ELIZABETSKY *et al.*, 1995), principalmente no Brasil e especificamente na Amazônia, região privilegiada por deter parte da biodiversidade vegetal (NODARI; GUERRA, 2010).

Neste contexto, Firmo e colaboradores (2011) relatam que a maioria das plantas medicinais são utilizadas apenas com base no conhecimento popular, observando-se a carência do conhecimento científico acerca de suas propriedades farmacológicas e toxicológicas.

Tal fato ressalta a importância destes estudos, com o intuito de validar ou não o uso destas plantas e de oferecer mais segurança às populações que as utiliza, sendo que a toxicidade de plantas pode trazer sérias consequências à saúde (Veiga Júnior; Pinto, 2005). Pesquisas desta

natureza podem contribuir para o desenvolvimento de novos fitofármacos e para agregar valor à biodiversidade da região amazônica.

Uma das famílias mais representativas dessa região é a Myrtaceae, que se destaca como fonte de uma variedade de metabólitos secundários, sendo alvo de pesquisas na área farmacológica (Mori *et al.*, 1983). Dentro da família Myrtaceae, os maiores gêneros em quantidade de espécie são *Eugenia* e *Myrcia*, sendo que *Myrcia* tem se destacado pela quantidade de pesquisas na área farmacológica.

A espécie *Myrcia amazonica*, conhecida popularmente como pedra-ume-caá, foi estudada no presente trabalho a partir do conhecimento tradicional de sua utilização para tratamento de diversas patologias, além da carência de estudos publicados sobre as atividades farmacológicas dessa espécie. Será apresentada a seguir uma breve revisão sobre as principais temáticas abordadas neste estudo.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Plantas Medicinais

O termo planta medicinal foi oficialmente definido, durante a 31ª Assembléia da Organização Mundial de Saúde (OMS), sendo então definido como “aquela que administrada ao homem ou animais, por qualquer via ou sob qualquer forma, exerce alguma espécie de ação farmacológica” (SILVA, 2012).

Nas últimas duas décadas, o interesse por plantas medicinais e respectivos produtos tem aumentado, impulsionando a abertura de mercados nacionais e mundiais na área de fitoterápicos e plantas bioativas. Atualmente, há descobertas constantes sobre o uso de plantas na área terapêutica (KIM *et al.*, 2004; LARREY; FAURE, 2011; MILIAUSKAS *et al.*, 2004; MIRANDA *et al.*, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2008; RODRIGUES, 2011; ETHUR *et al.*, 2011) e a exploração comercial dessas plantas apresenta perspectivas cada vez mais promissoras de se tornar uma atividade economicamente rentável (APRILE; SIQUEIRA, 2012).

Segundo Almeida (2011), a OMS orienta que haja uma conexão entre a medicina tradicional empírica e a medicina científica, de modo que os medicamentos à base de plantas não sejam aceitos como verdade absoluta sem questionamentos, mas que também não sejam refutados por puro preconceito, tendo em vista que a terapêutica moderna emprega grande número de substâncias que, embora sejam obtidas na sua maioria por intermédio de síntese, foram originalmente isoladas de espécies vegetais.

Em 2006, o Ministério da Saúde no Brasil estabeleceu uma política de regulação chamada de Política Nacional de Plantas Medicinais Fitoterápicos, com o objetivo de melhorar a saúde, o uso sustentável da biodiversidade, promover o respeito à diversidade regional (cultural e ambiental), além de aumentar a conscientização e participação da comunidade nessas questões (COELHO, 2009). Essa política tem como diretriz garantir aos usuários do sistema único de saúde (SUS) o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos, com eficácia, qualidade e segurança, visando à melhoria da atenção à saúde e à inclusão social (BRASIL, 2009).

Apesar das plantas medicinais serem recomendadas pelo SUS, o uso das plantas medicinais nos serviços públicos de saúde ainda não se tornou uma realidade nacional. Isso pode ser explicado pela escassez de dados científicos sobre as espécies nativas ou a falta de sistematização dos dados já existentes (BARBOSA *et al.*, 2009). Mesmo havendo mais de 70 anos de pesquisa com plantas medicinais no país, o número de espécies estudadas ainda é muito reduzido (CARVALHO *et al.*, 2010).

Simões e Schenkel (2002) corroboram esta afirmação, pois relatam que as plantas medicinais brasileiras são consideradas altamente promissoras no campo farmacológico, no entanto, são pouco conhecidas sob qualquer ponto de vista, sendo que apenas 8% das espécies vegetais nativas brasileiras foram estudadas em busca de moléculas bioativas (NODARI; GUERRA, 2010).

Dentre as espécies com grande potencial farmacológico, destacam-se representantes da família Myrtaceae, as quais além de serem utilizadas na medicina popular para tratar diversas patologias, têm sido objeto de trabalhos científicos com intuito de investigar suas propriedades biológicas (ROSA *et al.*, 2007; SILVA *et al.*, 2015; ALMEIDA *et al.*, 2014)

1.1.2 Família Myrtaceae

A Família Myrtaceae, é pertencente à ordem Myrtales sendo encontrada predominantemente nas regiões tropicais e subtropicais do mundo, com muitas espécies concentradas na região tropical da América e na Austrália. Espécies dessa família são encontradas em praticamente todos os *habitat* terrestres, com exceção das regiões áridas e semiáridas ao redor do mundo (SMITH *et al.*, 2004). A Família Myrtaceae está representada, no mundo por 132 gêneros e 5.671 espécies e tem como centros de diversidade os trópicos úmidos, especialmente na América do Sul, Austrália e Ásia Tropical (GOVAERTS *et al.*, 2008).

O levantamento mais recente para o Brasil lista 23 gêneros e 1034 espécies para a família, dos quais 4 gêneros e 797 espécies são assinalados como endêmicos, sendo 169 espécies

restritas à Amazônia brasileira e oito endêmicas para o estado do Pará (SOBRAL *et al.*, 2015). Além disso, apenas 26 espécies são definidas como raras para o país (ROSÁRIO *et al.*, 2004; ROSÁRIO; SECCO, 2006; FUNCH *et al.*, 2009).

Na família Myrtaceae existem espécies com utilização popular que fazem parte de Monografias da Farmacopéia Brasileira V Edição (BRASIL, 2010). Dessa forma, é imprescindível a existência de referências morfológicas e anatômicas com as quais as amostras das espécies possam ser confrontadas, garantindo assim a autenticidade. Isso é importante porque entre as plantas, muitas espécies podem ser confundidas morfológicamente e por apresentarem os mesmos nomes populares (DONATO; MORRETES, 2005). Farias (2004) ressalta que a identificação rigorosa das plantas e o estabelecimento de parâmetros de qualidade necessários à utilização das mesmas, além de garantir um uso seguro, evita fraudes e intoxicações por utilização do material mal identificado. Nas espécies americanas de Myrtaceae, as espécies se assemelham bastante morfológicamente, logo a identificação e classificação das mesmas é algo trabalhoso (MCVAUGH, 1968, apud DONATO; MORRETES, 2005). Portanto, os caracteres anatômicos ganham importância nesta família, por acrescentarem dados ao conjunto de informações que possibilitam a diagnose das espécies vegetais.

O gênero *Myrcia* compreende cerca de 400 espécies tropicais e subtropicais desde o México e Caribe até o norte da Argentina (LANDRUM; KAWASAKI, 1997). Na região de Santarém-Pará, espécies desse gênero são abundantes em ambientes de vegetação aberta, como cerrado e bordas de matas secundárias (ALMEIDA, 2009).

Algumas espécies desse gênero possuem amplo espectro de atividades farmacológicas, tais como propriedades hipoglicemiante, diurética, hipotensora, antagonista da bradicinina (MORS; GRUNE, 1978), antidiarréica (ALMEIDA, 1993), antimicrobiana (CERQUEIRA *et al.*, 2007), antitumoral (HECHT, 1984), antiedematogênica e antinociceptiva (ALMEIDA, 2014) além da atividade hepatoprotetora comprovada por Xu e colaboradores (2009). Várias espécies são também utilizadas em tribos indígenas e comunidades tradicionais com finalidade adstringente, diurética, antidiabética, antidiarreica, anti-inflamatória, anti-hipertensiva, para estancar hemorragias e para tratar úlceras bucais (CERQUEIRA *et al.*, 2013).

Vários são os estudos na literatura a respeito de extratos e óleo essencial extraído de partes dos vegetais do gênero *Myrcia*, principalmente das folhas (LIMBERGER *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2005; MAGINA *et al.*, 2009). As folhas da *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. (pedra-ume-caá), por exemplo, são utilizadas como hipoglicemiante na forma de infuso ou decocto e possuem atividade antidiabética atribuídas ao isolamento da mirciatricina I e

mirciafenona B (LIMBERGER, 2004). Essa atividade está associada à inibição das enzimas aldose redutase e alfa-glicosidase. Um estudo farmacológico demonstrou atividade de extratos de folhas de *Myrcia fallax* (Rich.) DC. contra células tumorais do tipo KB (LIMBERGER, 2004).

Dentro do gênero *Myrcia*, um grupo de espécies conhecidas como pedra-ume-caá é utilizado na medicina popular no tratamento de diversas enfermidades, tais como diabetes, aftas, leucemia, inflamações uterinas, ferimentos e doenças infecciosas (SILVA, 2012). Na literatura sobre Myrtaceae, verificou-se que nove espécies são denominadas popularmente como pedraume-caá, sendo elas: *Eugenia biflora* (L.) DC., *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC., *Myrcia amazonica* DC., *Myrcia citrifolia* (Aubl.) Urb., *Myrcia guianensis* (Aubl.) DC., *Myrcia multiflora* (Lam.) DC. (chamada de *Myrcia sphaerocarpa* DC. por alguns autores), *Myrcia salicifolia* DC., *Myrcia speciosa* (Amshoff) McVaugh. e *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. (CRUZ; KAPLAN, 2004; JORGE *et al.*, 2000; LIMBERGER *et al.*, 2004; SILVA, 2012; SOUZA FILHO *et al.*, 2006).

Dentro desse grupo de espécies conhecidas como pedra-ume-caá, destaca-se a *Myrcia amazonica* DC. que é o objeto de estudo do presente trabalho. Esta espécie é classificada como um arbusto ou uma árvore, medindo entre dois e seis metros de altura (ROSA, 2009). E não são encontrados na literatura estudos que forneçam subsídios farmacológicos e toxicológicos para o estabelecimento dos parâmetros de controle de qualidade da matéria-prima vegetal de *M. amazonica*. Também não são encontrados na literatura estudos sobre nocicepção, inflamação nem sobre hepatotoxicidade ou neurotoxicidade.

1.1.3 Nocicepção

A dor é uma sensação importante, pois é através dela que se percebe um sinal de alerta para um perigo iminente, estando assim relacionada com a proteção do organismo, mostrando os limites que não podem ser transgredidos (CHAPMAN; GAVRINI, 1999; MILLAN, 1999; DIAS, 2007).

Apesar das sensações dolorosas serem um aviso do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com o meio (PIRES, 2007).

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), 1994, como sendo “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Esta também é considerada um

mecanismo de proteção do organismo, sendo que a percepção da dor e a resposta do organismo a esta é denominada de nocicepção (LANA *et al.*, 2006). A dor pode causar incapacidade, pela redução da função do tecido lesado, devido à lesão estrutural ou edema tecidual (BERTOLINI *et al.*, 2011).

A dor se manifesta de diferentes formas e por isso não pode ser entendida ou tratada como uma entidade única (BESSON, 1999). Cada tipo de dor possui mecanismos próprios e necessita de manejo específico, sendo, portanto, necessário o entendimento preciso de cada um deles. A compreensão destes mecanismos, dos mediadores envolvidos e das adaptações que sofre o organismo é importante para o desenvolvimento de novos fármacos analgésicos que atuem no controle específico deste sintoma (OLINDA, 2010)

Em 1906, Sherrington propôs a existência do nociceptor, um neurônio sensorial primário sensibilizado por fatores mecânicos, químicos e pela temperatura. Estes estímulos são capazes de causar injúria tecidual e, conseqüentemente, liberar mediadores inflamatórios provenientes de células não-neuronais, como neutrófilos, mastócitos e plaquetas e podem ser ativados por estímulos de vários tipos, tais como: mecânicos, térmicos e químicos (CESARE; MCNAUGHTON, 1997; BASBAUM *ET AL*, 2009; SELTZMAN *et al.*, 2009).

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda tem função de alerta do corpo para lesões, inflamação ou doença, sendo transitória e de curta duração (MOOREA, 2009); já a dor crônica é aquela que persiste além do tempo razoável para a cura da lesão ou que está associada a processos patológicos crônicos, sendo de caráter contínuo ou recorrente (SALVETTI; PIMENTA, 2007).

A necessidade pela descoberta de novas substâncias capazes de impedir que o estímulo doloroso alcance o SNC e que ao mesmo tempo cause o mínimo de efeitos colaterais tem impulsionado o desenvolvimento de muitos testes em modelos animais com o intuito de avaliar o potencial antinociceptivo destas substâncias (FREIRE *et al*, 2015). Embora os animais submetidos a um estímulo nociceptivo não tenham capacidade de se comunicar verbalmente quando submetidos à dor, são capazes de exibir respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes àquelas observadas em humanos. Essas respostas comportamentais são estudadas e comparadas com drogas potencialmente analgésicas que interferem no processo fisiológico da dor, o que permite inferir se um animal está experimentando uma resposta algica (PERAZA *et al.*, 2007).

1.1.4 Inflamação

Inflamação é uma reação de defesa do organismo à penetração de um agente infeccioso, entrada de um antígeno ou dano celular. A inflamação se constitui em um processo biológico fundamental, com o objetivo de destruir, imobilizar ou diluir o agente lesivo (KULINSKY, 2007). Em seus aspectos microscópicos, pode ser definida ainda como “uma reação da microcirculação induzida por uma agressão aos tecidos, com a consequente movimentação de elementos intravasculares, como fluidos, células e moléculas, para o espaço extravascular” (SIQUEIRA JR.; DANTAS, 2000). A medida que essas mudanças acontecem, são produzidos cinco sinais cardeais da inflamação: rubor, calor, edema, dor e perda da função local (SMELTZER *et al.*, 2009).

Todas as respostas envolvidas nos eventos inflamatórios, em qualquer fase do processo, são originadas por mediadores químicos oriundos do plasma sanguíneo ou de células que se encontram no local da “lesão”, sejam elas constantemente presentes (ex.: fibroblastos, mastócitos e macrófagos) ou não (ex.: neutrófilos e eosinófilos). Estes mediadores participam da resposta inflamatória amplificando e influenciando sua evolução (BAUHMANN; GAULDIE, 1994).

É importante destacar que o processo inflamatório é diferente de uma infecção, uma vez que um agente infeccioso é somente um dos fatores que pode deflagrar uma resposta inflamatória. A infecção existe quando o agente infeccioso está vivendo, crescendo e se reproduzindo nos tecidos e ainda é capaz de superar as defesas naturais do organismo (SMELTZER *et al.*, 2009).

De acordo com a duração e as características da inflamação, a mesma pode ser classificada em aguda ou crônica. A inflamação aguda é a reação precoce e imediata dos tecidos à injúria, sendo de duração relativamente curta (horas ou dias) e caracterizada por vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas e uma migração de células para o local da lesão (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Por outro lado, a inflamação crônica tem uma duração mais prolongada (semanas, meses ou até anos), resultando da persistência da inflamação aguda e caracterizada pela presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (PORTH; MATFIN, 2010).

O processo inflamatório pode se manifestar a partir de qualquer agente lesivo, seja físico (queimadura, radiação, trauma), químico (substâncias cáusticas) ou biológico (microrganismos) (XU *et al.*, 2014).

Uma vez detectados patógenos ou lesão tissular, células do local da lesão passam a liberar mediadores químicos, como citocinas, histamina e bradicinina, serotonina, prostaglandinas, leucotrienos, substância P, dentre outros. Estes mediadores promovem modificações vasculares, tais como vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo local, seguido de uma redução na velocidade do fluxo e estase sanguínea. Estas modificações contribuem para o aparecimento de calor e vermelhidão, que constituem os sinais cardinais iniciais da inflamação. Outra modificação é o aumento da permeabilidade vascular com o extravasamento de fluido rico em proteínas (exsudato) para os tecidos, resultando na formação de edema e dor, que também constituem sinais cardinais da reação inflamatória (LAWRENCE *et al.*, 2002; SILVA, 2012). Além destes, a inflamação pode ocasionar um quinto sinal, que é a perda da função, sendo este decorrente de diversos fatores, mas principalmente do edema e da dor (FRANCO *et al.*, 2010).

1.1.5 Toxicidade de Plantas Medicinais

O uso de plantas com finalidade terapêutica, bem como de outras substâncias exige a avaliação de parâmetros como a atividade biológica e principalmente a sua toxicidade (CALIXTO, 2005). Baseado em princípios da toxicologia é correto afirmar que qualquer substância pode ser considerada um agente tóxico, dependendo das condições de exposição como a dose, tempo, frequência de exposição e a via de administração. Por isso é fundamental conhecer as condições seguras de uso das mais variadas substâncias químicas de origem vegetal, animal ou mineral, a fim de evitar danos à saúde do homem ou ainda agravos ao meio ambiente e óbitos (VENÂNCIO, 2006).

No que diz respeito ao uso de plantas medicinais, existe por parte da população a crença na “naturalidade inócua” desses produtos, o que muitas vezes é difícil de ser contraposto, já que as informações a respeito de intoxicações e efeitos colaterais dificilmente chegam ao alcance da população (SILVA, 2012; CARMONA; PEREIRA, 2013).

No entanto, o uso milenar de plantas medicinais mostrou que muitas espécies apresentam substâncias potencialmente tóxicas, representando um problema sério de saúde pública no mundo (RODRIGUES *et al.*, 2011; ALOMAR, 2014).

Os produtos naturais são constituídos por uma vasta diversidade de compostos químicos, os quais podem exercer diferentes efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos no organismo. As plantas medicinais são agentes xenobióticos que apresentam produtos de biotransformação potencialmente tóxicos. Assim, não possuem somente efeitos imediatos e facilmente

correlacionados com sua ingestão, mas também efeitos que se instalam em longo prazo e de forma assintomática, podendo levar a um quadro clínico severo, até mesmo fatal (LAPA *et al.*, 2004).

Reações adversas podem ocorrer devido a tratamento subcrônico ou crônico com fitoterápicos, destacando-se a neurotoxicidade e a hepatotoxicidade (DEBBIE *et al.*, 2012).

1.1.5.1 Hepatotoxicidade

Existem muitos efeitos tóxicos de plantas medicinais, sendo a hepatotoxicidade uma das principais preocupações em decorrência do papel do fígado no metabolismo de drogas (XUE *et al.*, 2014). O confrei (*Symphytum officinale* L.), por exemplo, uma planta bastante utilizada na medicina tradicional como cicatrizante, possui alcalóides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (MOREIRA *et al.*, 2014). A utilização desta espécie como recurso terapêutico foi proibida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) após diversos casos de morte provocados por estes alcalóides (VEIGA JÚNIOR; PINTO, 2005).

Nas últimas décadas tem se tornado notável o espectro de alterações hepáticas induzidas por medicamentos sintéticos e fitoterápicos, variando de leve disfunção, caracterizada por elevações transitórias e assintomáticas das enzimas hepáticas e sintomas clínicos reversíveis, à icterícia, hepatite aguda ou crônica, cirrose e insuficiência hepática grave, que pode culminar em transplante de fígado ou morte (BALBINO; DIAS, 2010; LARREY; FAURE, 2011; MOREIRA *et al.*, 2014). A hepatotoxicidade induzida por medicamentos é dependente da dose e pode ser prevenida por estudos pré-clínicos e clínicos, avaliada pelos níveis plasmáticos das enzimas alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) (RAJARAMAN *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2014). Estas enzimas constituem importantes marcadores de danos hepáticos, pois segundo Vijayalakshmi e colaboradores (2000), uma droga não provoca dano algum ao fígado sem interferir com a atividade normal dessas enzimas.

1.1.5.2 Neurotoxicidade

Além dos efeitos hepatotóxicos de plantas medicinais, pode-se mencionar também os efeitos tóxicos sobre o sistema nervoso central. De acordo com Coroad-Artal (2003), uma ampla variedade de plantas pode desencadear efeitos neurotóxicos.

O Comitê Interinstitucional de Neurotoxicologia define neurotoxicidade como efeitos adversos sobre a estrutura ou função do Sistema Nervoso Central (SNC) ou Sistema Nervoso Periférico (SNP), causados por agentes biológicos, químicos ou físicos, os quais podem ser permanentes ou reversíveis e resultar de ações diretas ou indiretas sobre o sistema nervoso (SLIKKER JR E BOWYER, 2005).

Os métodos comportamentais objetivam avaliar respostas de animais quanto à função motora através de metodologias de esforço, resistência muscular e ainda a função sensorial e o comportamento cognitivo, sendo este avaliado através de parâmetros como o aprendizado e memória espacial (KULLIG *et al.*, 1996).

A memória espacial corresponde a função do cérebro responsável pelo reconhecimento, codificação, armazenamento e recuperação de informações espaciais sobre a disposição de objetos e rotas específicas (Kessels *et al.*, 2001), sendo o labirinto aquático de Morris a análise comportamental mais conhecida e aceita para a avaliação deste parâmetro (D'HOOGHE & DE DEYN, 2001).

Para avaliação de memória, aprendizagem, atenção, comportamento social e resposta sensorial vários tipos de testes podem ser realizados. Entre eles o teste da barra giratória (rotarod) é útil para mensurar a coordenação motora e modificações no tônus muscular dos animais após o tratamento farmacológico em função de seu tempo de permanência na barra (GOMES *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que as plantas medicinais, seus derivados e constituintes são capazes de modificar o comportamento de animais e podem ser úteis no tratamento casos de ansiedade, depressão ou crises epiléticas. Medicamentos à base de plantas, cujo potencial farmacológico é avaliado em modelos animais e neuroquímicos, podem se tornar novas opções terapêuticas na psiquiatria clínica (ARAÚJO, 2013).

Por isso considerando a representatividade da família Myrtaceae no Brasil e ainda a escassez de investigações da atividade biológica dessa espécie, neste trabalho encontra-se o estudo de atividades farmacológicas e de toxicidade das folhas de *M. amazonica*.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral:

- ✓ Avaliar o potencial farmacológico do extrato hidroalcolico de folhas de *Myrcia amazonica* DC. assim como investigar seus efeitos tóxicos.

1.2.2 Objetivos Específicos:

- ✓ Caracterizar a droga vegetal quanto a granulometria, índice de intumescência e doseamento de fenóis totais, flavonóides e taninos.
- ✓ Analisar variações no peso corporal dos animais submetidos ao tratamento subcrônico do EHAMa.
- ✓ Avaliar o efeito antiedematogênico e antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de folhas de *M. amazônica*;
- ✓ Investigar os possíveis efeitos neurotóxicos do tratamento agudo e subcrônico de *M. amazonica* sobre a locomoção, memória e aprendizagem de ratos Wistar;
- ✓ Investigar os possíveis efeitos hepatotóxicos do tratamento subcrônico do EHAMa;

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Seleção, coleta e obtenção do material botânico

A coleta do material vegetal ocorreu em áreas de savana, nas proximidades da comunidade de Santa Rosa, quilômetro 12 da Rodovia Everaldo Martins, Município de Santarém–Pará–Brasil. As folhas foram coletadas de exemplar nativo na fase fértil, durante o período seco no mês de setembro em 2013 (Figura 01). A posição de ocorrência da espécie foi determinada através de um sistema GPS (Global Position System) (GARMIN modelo eTrex Vista H), obtendo as seguintes coordenadas geográficas: latitude 02°30'28.1" S e longitude 54°50'55,9" W, com altitude aproximada de 89,6 metros em relação ao nível do mar.

A espécie avaliada nesse estudo está associada ao banco de dados do Laboratório de Bioprospecção e Biologia Experimental da Universidade Federal do Oeste do Pará (LabBBEXUFOPA). A planta foi identificada pelo professor Ramos, J.F. do Instituto Nacional de Pesquisas Amazônicas (INPA) e exsiccatas dessa espécie estão depositadas no Herbário do INPA sob o código 250.3639.

As folhas de *M. amazonica* foram separadas e devidamente sanitizadas de acordo com as boas práticas de processamento, pesadas em balança digital (Balmak® - MP-5), armazenadas em sacos de papel e desidratadas em estufa (LICit® - LC-E80) com circulação forçada de ar a

40 °C até peso constante com umidade abaixo de 8%. Após a desidratação, o material seco foi pulverizado em moinho de facas (Tron®) e acondicionado ao abrigo de luz e umidade.



Figura 01: *Myrcia amazonica* DC.

2.2 Caracterização da matéria prima vegetal

A matéria prima vegetal pulverizada foi caracterizada segundo a farmacopéia 5^a ed. (Brasil 2010) no Laboratório de Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação de Bioprodutos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Goiás (Lab de PD&I de bioprodutos/FFUFG). Os parâmetros utilizados para caracterização foram: granulometria, índice de intumescência em água e em solução hidroalcolica 65%.

2.2.1 Granulometria

A determinação do grau de divisão ou granulometria da droga vegetal pulverizada em estudo foi feita com o auxílio de tamises de aço inoxidável (Bertel®), operados por um agitador eletromagnético para peneiras (Bertel®), dispositivo que reproduz os movimentos horizontais e verticais da operação manual, por meio de ação mecânica uniforme (BRASIL, 2010).

Foi montado um conjunto com 6 tamises com aberturas de malha descritas na Farmacopeia Brasileira nº 5 (600, 425, 250, 180, 125 e 75 µm), os de maior abertura colocados

sobre os de abertura menor, e armados sobre o receptor de tamises. Exatamente 25 g da amostra foram distribuídos uniformemente sobre o tamis superior e o conjunto foi tampado. O tamisador foi acionado por 15 minutos, utilizando o reostato nº 7 - amplitude das vibrações de 1,4 mm. Ao fim da tamisação, com o auxílio de um pincel adequado, toda a amostra retida na superfície superior de cada malha foi cuidadosamente removida para um recipiente limpo e pesado, assim como o pó retido no coletor. Para calcular o percentual retido em cada tamis, foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\% \text{ retida pelo tamis} = \frac{P_1}{P_2} \times 100$$

Onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (g).

P_2 = Soma dos pesos retidos nos tamises e no coletor (g).

100 = Fator de conversão para porcentagem.

O percentual retido em cada tamis foi utilizado para o cálculo do percentual de pó que passou por cada tamis, para classificação do pó obtido das folhas secas de *M. amazonica* como pó grosso, moderadamente grosso, semifino, fino ou finíssimo, de acordo com a Farmacopeia Brasileira nº 5. A determinação granulométrica foi realizada em triplicata.

2.2.2 Determinação do índice de intumescência

Para avaliação do índice de intumescência, foi utilizada uma proveta de 25 mL, com tampa, com comprimento da parte graduada de 125 mm e diâmetro interno de 16 mm, subdividido em 0,1 mL e marcado de 0 a 25 mL, de forma ascendente. Exatamente 1 g da droga vegetal pulverizada foi pesado e transferido para a proveta, adicionando, em seguida, 25 mL água destilada e agitando a cada 10 minutos, durante 1 hora, de forma padronizada. Após repouso da mistura por 3 horas, à temperatura ambiente, foi medido o volume, em mL, ocupado pela droga vegetal, subtraído do volume inicial da droga. Foi calculado o valor médio obtido a partir de três determinações individuais e relacionado a 1 g de material vegetal (BRASIL, 2010). O mesmo procedimento foi feito utilizando solução hidroalcolica a 65% em substituição à água destilada para determinar o índice de intumescência utilizando este solvente.

2.3 Obtenção do extrato hidroalcolico 65 %

O extrato hidroalcolico de *M. amazonica* 65% (EHAMa) foi fornecido pelo Lab de PD&I de bioprodutos/ FF-UFG. Onde foi obtido através do método de percolação descrito na farmacopeia Brasileira 2ª ed., metodologia adaptada e padronizada no Lab de PD&I de bioprodutos/ FF-UFG (BRASIL,1959). Foi utilizado como solvente extrator a solução hidroalcolica 65% (v/v) baseado em estudos prévios de otimização realizados para esta planta.

Antes da percolação foi feito o processo de maceração com 900 g da droga vegetal pulverizada diluída em 9L da solução hidroalcolica por doze horas.

Depois de percolado o extrato foi então concentrado em rota-evaporador modelo BUCHI R220 e utilizou-se a temperatura do banho maria 45°C à pressão atmosférica de 130 mbar e 70 RPM.

O EHAMA foi então distribuído em bandejas e colocado em estufa com circulação forçada de ar à 40°C por 72 horas e obteve-se o extrato seco.

2.4 Estudos *in vivo*

Nesse trabalho, as atividades antinociceptiva, antiinflamatória e a toxicidade do extrato hidroalcolico foram avaliadas por meios de experimentação animal. Foram utilizados ratos machos adultos da linhagem Wistar (*Rattus norvegicus*) pesando entre 200–300g e camundongos machos adultos da linhagem Swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20 e 40g. Todos os animais foram fornecidos pela Unidade de Experimentação Animal do LabBBExUFOPA.

Os animais foram mantidos em ambiente com temperatura controlada (24±2°C), com livre acesso à água e alimentação e ciclo claro/escuro de 12/12 horas.

Os ratos foram utilizados nos ensaios de toxicidade e de atividade antiedematogênica, enquanto os camundongos foram utilizados nos ensaios de avaliação antinociceptiva. Os experimentos foram realizados em acordo com as diretrizes para os procedimentos de uso científico de animais estabelecidas pelas Lei Federal 11.794 de 08/10/2008 e com aprovação do Comitê de Ética no uso de Animais da UFOPA, protocolado sob o número N° 10015/14.

2.5 Testes farmacológicos

2.5.1 Edema de pata induzido por carragenina

A avaliação da atividade antiedematogênica do EHAMa foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Winter *et al.*, 1962 onde foram utilizados ratos machos (*Rattus norvegicus*) Wistar distribuídos em 5 grupos (n=5). Os animais receberam via oral (v.o.) por gavagem os seguintes tratamentos:

Grupo 1: Controle (água destilada – 1 mL/kg)

Grupo 2 = EHAMa (360 mg/kg)

Grupo 3 = EHAMa (480 mg/kg)

Grupo 4 = EHAMa (600 mg/kg)

Grupo 5 = Indometacina (Indocid ®) (10 mg/kg)

Após uma hora da administração dos tratamentos, o edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (Sigma Aldrich Company) (1% em solução salina) na região subplantar da pata posterior direita de cada animal. O volume da pata foi medido por meio de um pletismômetro digital Insight EFF 304 (Figura 4), imediatamente após a injeção da carragenina (tempo zero), e com intervalos de 1, 2, 3, 4 e 5 h após a indução do edema.

A ação antiedematogênica do EHAMa e da indometacina foi expressa usando como unidade de medida a quantidade em mL de água deslocada pelo edema no pletismômetro, sendo que o volume do edema equivale à diferença entre o volume da pata em cada medição e o volume tomado imediatamente após a injeção do agente flogístico.

O percentual de inibição do edema foi obtido segundo a fórmula descrita por Xu e colaboradores (2014):

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{aumento no edema (controle)} - \text{aumento no edema (tratamento)}}{\text{aumento no edema (controle)}} \times 100$$

2.5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Nesse teste foi utilizado o método descrito por Koster e colaboradores (1959), no qual camundongos Swiss, (n=5) por grupo, receberam através de gavagem v.o, o EHAMa nas doses de 360, 480 e 600 mg/kg diluído em água. O anti-inflamatório padrão utilizado no grupo

controle positivo foi o Ácido acetilsalisílico (AAS® - *Laboratório Sanofi Aventis*) 200mg/kg e o grupo controle negativo recebeu somente água 1mL/kg.

Após uma hora da administração dos respectivos tratamentos foi administrado ácido acético 0,6% 0,1mL/10g via intraperitoneal em todos os animais para a indução de contorções abdominais. Decorridos dez minutos, o número de contorções abdominais foi observado e registrado durante 20 min.

2.6 Testes toxicológicos

O grau de toxicidade aguda e subcrônica dos extratos vegetais sobre a locomoção, memória e aprendizado de ratos foi avaliada por meio de testes de comportamento animal. Todos os testes foram realizados utilizando-se a dose de 600 mg/kg do EHAMa, sendo esta a maior dose testada nos testes farmacológicos. Foram utilizados 2 grupos de ratos Wistar machos (n=5):

Grupo 1: Controle (água destilada – 1 mL/kg) **Grupo**

2: EHAMa (600 mg/kg)

Uma hora após a administração por gavagem dos respectivos tratamentos, os animais foram avaliados por meio de testes comportamentais: labirinto aquático de Morris e barra giratória. Este procedimento foi realizado com o intuito de investigar os possíveis efeitos tóxicos do tratamento agudo do EHAMa.

Para a avaliação dos efeitos tóxicos do tratamento subcrônico do extrato, os dois grupos de animais continuaram a receber os devidos tratamentos durante 21 dias consecutivos. Após, foram novamente submetidos aos testes comportamentais mencionados.

Durante todo o período de administração do extrato os animais foram monitorados diariamente quanto a alterações no peso corporal.

2.6.1 Labirinto aquático de Morris

O efeito do tratamento agudo e subcrônico do EHAMa sobre a memória espacial e aprendizagem de ratos foi avaliado por meio do labirinto aquático de Morris (MORRIS, 1984). Nesse teste, utilizou-se uma caixa d'água de 500 L, preenchida com água a uma altura de 40 cm, onde foi adicionado corante atóxico branco para torná-la opaca. A caixa d'água foi dividida em quatro quadrantes imaginários (norte, sul, leste e oeste) na qual foi colocada uma plataforma submersa a 2 cm abaixo do nível da água, localizada no centro do quarto quadrante. Próximo

ao segundo quadrante foi colocada uma lâmpada, que assim como os demais objetos do laboratório e o observador, foi utilizada pelo animal como ponto de referência para a localização da plataforma (Figura 02).

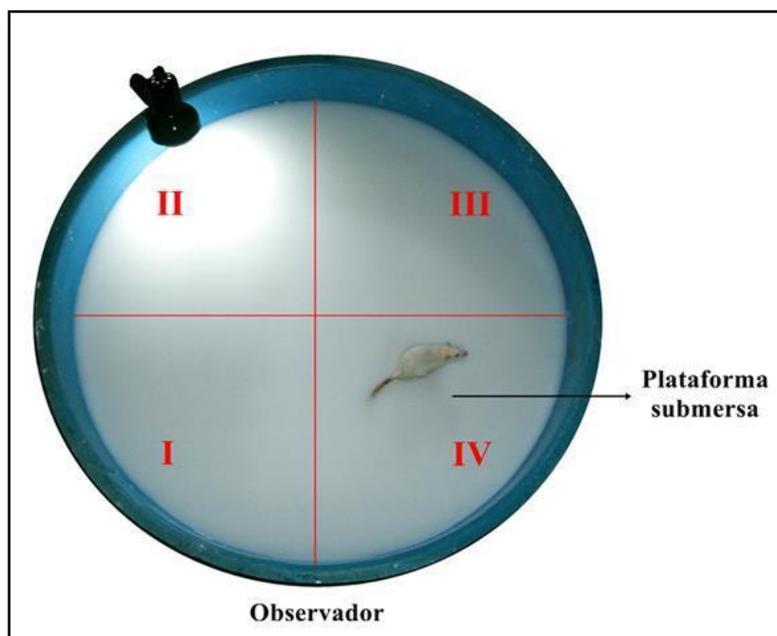


Figura 02. Desenho esquemático do Labirinto aquático de Morris. Fonte: Wânia Rodrigues, 2010.

Os animais foram submetidos a um treino (fase de aquisição de memória) para que os eles aprendessem a localização da plataforma submersa. Cada animal foi colocado quatro vezes no labirinto, adotando-se como ponto de partida cada um dos quadrantes. Após ser colocado na água, o animal nadou livremente, a procura da plataforma, durante 120s ou até encontrá-la, e quando não a encontrava era colocado manualmente sobre esta durante 10s para a observação do ambiente.

No dia seguinte (24h após o treino) os animais foram testados no mesmo procedimento para a retenção da resposta, sendo verificado o tempo, em segundos, que cada animal levou para encontrar a plataforma a partir dos quatro pontos de partida.

2.6.2 Teste da Barra giratórias

O objetivo de utilizar esse teste, proposto por Dunhan e Miya (1957), foi avaliar o efeito do EHAMA sobre a locomoção e coordenação motora dos animais.

O aparelho de Rota-rod (EFF 411 Insight ®) (Figura 03), equipamento utilizado para realização deste teste, com 45 cm de altura, 54 cm de largura e 35 cm de comprimento é constituído de uma barra giratória, dividido em quatro compartimentos iguais e que possui uma

velocidade regulável em rotações por minuto (r.p.m.). O procedimento consiste na avaliação da capacidade do animal de se manter sobre a barra que gira a uma velocidade constante.

Para isso, inicialmente foi realizado um treino com os animais visando à habituação e o aprendizado. O treino foi dividido em três séries de 120 segundos cada com velocidade de 10 r.p.m. 24 horas após o treino, os animais foram submetidos ao teste, onde foram novamente colocados na barra giratória em três séries de dois minutos e o resultado foi obtido pela média do tempo de permanência de cada animal no aparelho, sendo o tempo máximo de 120 segundos.



Figura 03. Aparelho Rota rod . Fonte: Amanda Azevedo, 2015

2.6.3 Hepatotoxicidade

Após a administração por 21 dias com EHAMA em ratos Wistar, foi feita a dosagem dos níveis séricos das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), com o intuito de avaliar os possíveis efeitos hepatotóxicos do extrato. Para isso, os animais foram anestesiados com cetamina e xilazina e foi realizada punção cardíaca para coleta das amostras de sangue. Foram colhidos 3 mL de sangue de cada animal, o qual foi centrifugado para obtenção do soro. A determinação dos níveis de AST e ALT no soro dos animais foi realizada com a utilização de kits comerciais (LABTEST ®), seguindo-se os procedimentos descritos pelo fabricante. A leitura das absorbâncias foi realizada em espectrofotômetro, modelo 3300 – UV.

2.7 Análise Estatística

Os resultados obtidos nos ensaios biológicos foram expressos como média \pm erro padrão da média do grupo. A análise de variância (ANOVA) e o teste de Tukey foram aplicados para avaliar a diferença entre os grupos, sendo considerados como valores significativos quando $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização da matéria prima vegetal

A tabela 01 apresenta os resultados da caracterização farmacopeica de *M. amazonica*.

Tabela 01: Caracterização farmacopeica do extrato hidroalcolólico das folhas secas de *M. amazonica*

Teste realizado.	Resultado
Granulometria	Pó classificado como moderadamente grosso segundo a Farmacopeia Brasileira 5ª edição.
Índice de intumescência em água	3,4 mL +/- 0,2
Índice de intumescência na solução hidroalcoólica 65% (v/v)	3,2 mL +/- 0,3

O tamanho das partículas da droga vegetal determina a superfície de contato disponível para a interação com o solvente utilizado no processo de obtenção do derivado vegetal (SILVA *et al.*, 2013; SALEH *et al.*, 2015). Assim, a análise da distribuição granulométrica da droga permite que se faça uma relação com a eficiência extrativa, já que partículas demasiadamente finas podem impedir a absorção do líquido extrator, enquanto que partículas com granulometria alta podem não ser adequadas por não apresentarem grande superfície de contato, da mesma forma, reduzindo a eficiência de extração (BORHAN *et al.*, 2013).

O índice de intumescência é a medida do volume ocupado pelo inchamento de 1 grama da amostra vegetal pela adição de água ou outro agente intumescente, sob condições definidas (MOTA *et al.*, 2014).

O volume ocupado pelo pó do EHAMA aumentou 1,51 vezes após o intumescimento por água, e 1,43 após o intumescimento por solução hidroalcoólica 65%, o que indica a presença de

substâncias capazes de aumentar seu volume em presença de água ou solução hidro alcoólica, tais como gomas, mucilagens, pectina e hemicelulose (OMS, 2011; PEREIRA *et al.*, 2011).

3.2 Testes farmacológicos

3.2.1 Edema de pata induzido por carragenina

Os resultados expressos na figura 04 mostram que o EHAMA possui efeito antiedematogênico significativo ($p \leq 0,05$), na dose de 600 mg/kg, a partir da terceira hora após a injeção do agente flogístico. O percentual de inibição do EHAMA na dose de 480 mg/kg variou de 15,5 a 45,5%, enquanto na dose de 600 mg/kg este percentual variou de 47,0 a 63,6%, Já os percentuais de inibição da indometacina, foram de 66 á 83% da primeira à quinta hora, respectivamente.

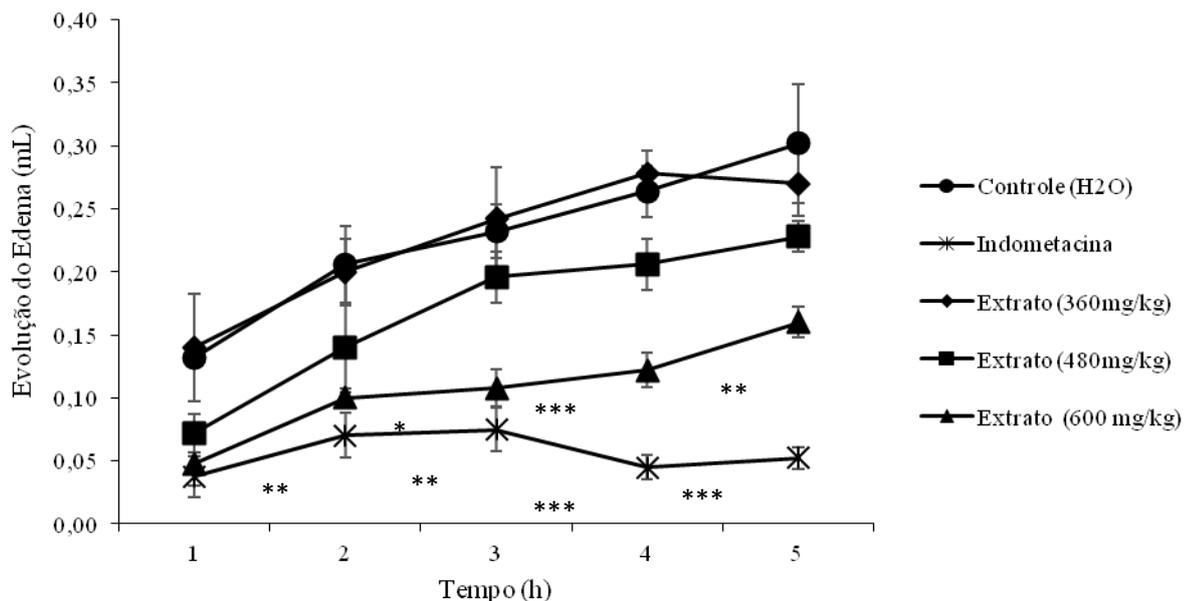


Figura 04: Efeito do EHAMA sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos Wistar. EHAMA = extrato hidrialcoolico de *Myrcia amazonia*. Os valores representam a média \pm erro padrão. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.

O edema induzido por carragenina é um modelo inflamatório agudo e amplamente aceito como uma ferramenta útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos (BAHAMONDE *et al.*, 2013). O desenvolvimento do edema provocado pela carragenina é um evento bifásico, caracterizado pela ação sequencial de vários mediadores inflamatórios (SALVEMINI *et al.*, 1996). A fase inicial, que ocorre de 0-2,5h após a injeção da carragenina,

envolve a liberação de histamina, serotonina e bradicininas, já a segunda fase (36h) é atribuída principalmente à liberação de prostaglandinas (WANG *et al.*, 2014).

No presente estudo, o extrato foi efetivo na segunda fase da inflamação, podendo-se sugerir que o mesmo pode atuar sobre a inibição da liberação de prostaglandinas.

A presença de flavonóides e taninos no EHAMA pode justificar o efeito antiedematogênico encontrado no presente estudo, haja vista que essas classes de metabólitos possui um amplo espectro de atividades biológicas (RATHEE *et al.*, 2009), sendo bem conhecidos seus efeitos anti-inflamatórios (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991; KIM *et al.*, 2004; GARCÍA-LAFUENTE *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2014), os quais são atribuídos principalmente pela capacidade destas substâncias de atuar sobre a inibição da liberação de importantes mediadores inflamatórios, tais como as histaminas e prostaglandinas (KIM *et al.*, 2004; RATHEE *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, foi demonstrado pela primeira vez o efeito antiedematogênico do extrato hidroalcolico de *M. amazonica*, confirmando assim o potencial terapêutico desta espécie. Este resultado justifica em parte o uso de *M. amazonica* na medicina popular. Porém, são necessários estudos adicionais para investigar os mecanismos de ação de seus constituintes químicos envolvidos no processo inflamatório.

3.2.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

No modelo experimental de dor induzida pelo ácido acético, o grupo controle negativo (n=5) previamente tratado com solução salina, obteve uma média de $55,6 \pm 5,9$ contorções durante os 20 min de avaliação experimental. O tratamento dos animais com EHAMA na doses de 360, 480 e 600 mg/kg, promoveu reduções significativas no número de contorções abdominais em 42,1%, 39,2% e 97,5% respectivamente, quando comparados com o grupo controle negativo. O ácido acetilsalicílico (AAS) na dose de 100 mg/kg, utilizado como controle positivo, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 71,6% ($15,8 \pm 2,5$). Os resultados podem ser observados na figura 05.

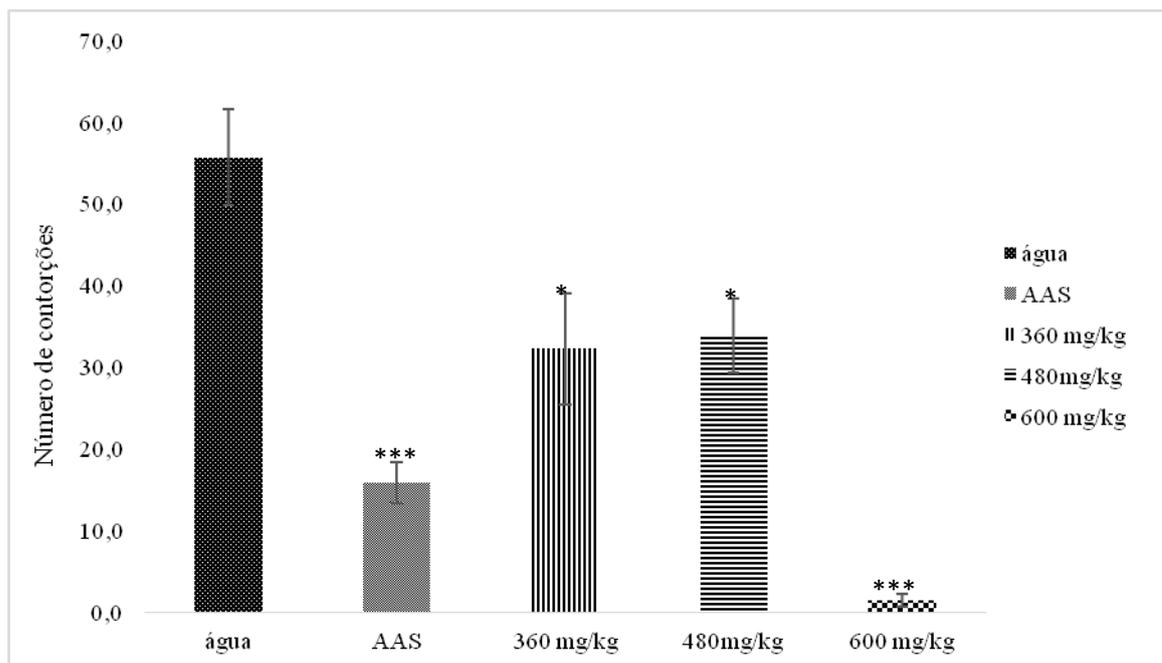


Figura 05. Número de contorções abdominais, induzida pelo ácido acético i.p. (0,6%), de camundongos machos tratados oralmente com a dose de 600mg/Kg do extrato hidroalcoólico de *Myrcia amazonica* (EHAMa). Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=5). ANOVA seguida de Teste de Tukey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.

Esse modelo experimental é empregado como ferramenta de triagem de novas drogas a serem testadas, como extratos de plantas e também substâncias isoladas, com possíveis propriedades analgésicas e/ou anti-inflamatórias (VYKLUCKY, 1979; TJOLSEN; HOLE, 1997). Esse ensaio, apesar de simples e pouco específico, é de fácil observação além de apresentar boa sensibilidade às drogas analgésicas e anti-inflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente (KOSTER *et al.*, 1959; IKEDA *et al.*, 2001; LE BARS *et al.*, 2001). Além disso, os resultados obtidos com várias classes de drogas analgésicas, neste ensaio, mostram boa correlação com a ação analgésica em outros estudos pré-clínicos (SIEGMUND *et al.*, 1957; BLANE *et al.*, 1967; COLLIER *et al.*, 1968).

Utilizando esse teste foi possível demonstrar, pela primeira vez, que a administração oral do EHAMA produziu redução do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O EHAMA, nas três doses testadas, promoveu reduções significativas nas contorções quando comparado ao grupo de animais que recebeu o controle. Esses resultados indicam, portanto que o efeito causado pelo EHAMA pode ser devido a inibição direta ou indireta da liberação de mediadores pró-inflamatórios ou até mesmo por uma modulação central da transmissão nociceptiva (RATES; BARROS, 1994). No entanto, são necessários ensaios complementares para a interpretação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do EHAMA

3.3 Testes Toxicológicos

3.3.1 Análise do peso corporal

Ao longo dos 21 dias de administração do EHAMa na dose de 600 mg/kg, não foram observados quaisquer sinais de morbidade ou mortalidade. Não houve diferenças significativas nas variações de peso corporal entre os animais tratados com o extrato e os animais do grupo controle (figura 06).

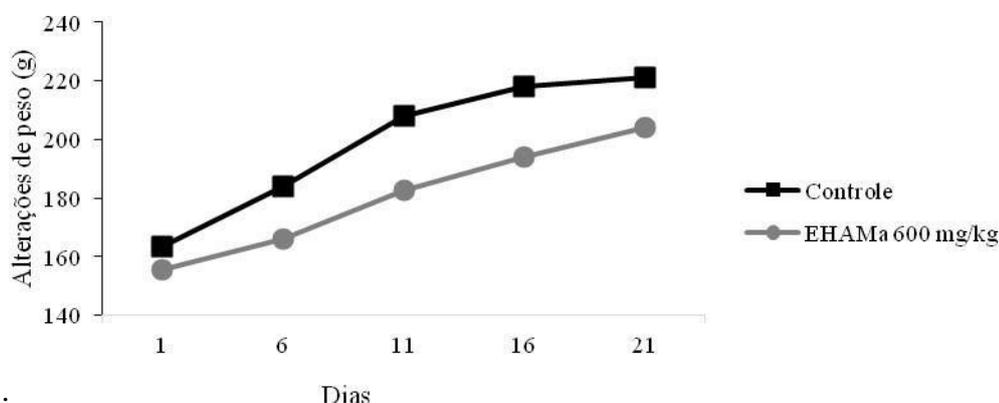


Figura 06: Alterações do peso corporal de ratos Wistar submetidos ao tratamento por 21 dias com o EHAMa. EHAMa = extrato hidroalcoólico de *Myrcia amazonica*.

Segundo Ezeja e colaboradores (2014), o comportamento geral dos animais e a avaliação do peso corporal representam parâmetros críticos para a avaliação dos primeiros sinais de toxicidade. Alterações de peso são importantes indicadores de efeitos adversos das drogas e de produtos químicos em animais de laboratório (AMENIA *et al.*, 2014). O resultado deste parâmetro indica, portanto, que o EHAMa na dose testada foi bem tolerado pelos animais.

3.3.2 Labirinto aquático de Morris

Como mostrado na figura 07, o tratamento agudo e subcrônico dos animais com o EHAMa (600 mg/kg) não comprometeu a memória espacial dos animais, pois os mesmos tiveram um bom desempenho na memorização e localização da plataforma submersa durante a realização desta tarefa.

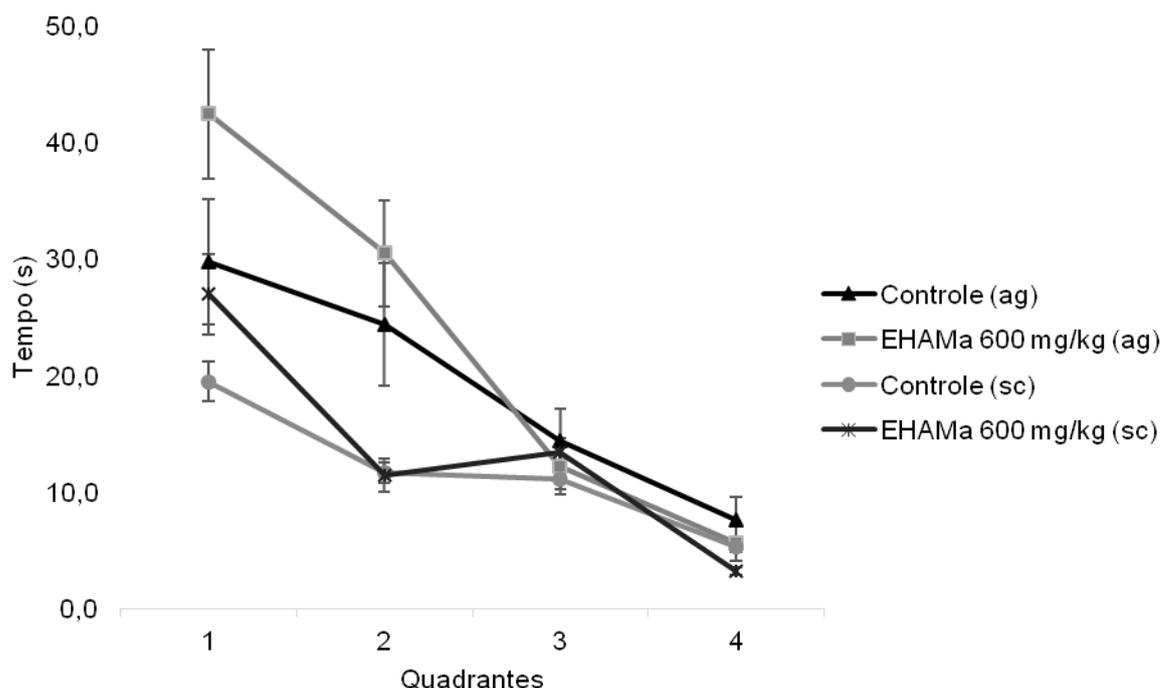


Figura 07: Efeito do tratamento agudo (ag) e subcrônico (sc) com EHAMa em ratos Wistar no teste do labirinto aquático de Morris. EHAMa = extrato hidroalcolóico de *Myrcia amazonica*. Os valores representam a média \pm erro padrão.

O labirinto de Morris é um modelo experimental utilizado na investigação da memória espacial em roedores (MORRIS, 1984). Segundo Whishaw e Mittleman (1986) ratos normais são capazes de utilizar estratégias de lugar, orientação e de guiamento simultaneamente para solucionar a tarefa de navegação espacial no labirinto aquático, sendo que os ratos treinados a buscar a plataforma partindo de diferentes pontos da borda do labirinto, como em nosso estudo, devem aprender sobre as posições relativas a esses estímulos de modo a desempenhar a tarefa, o que demanda uma estratégia de lugar, enquanto que ratos treinados partindo de um único ponto da borda do labirinto podem utilizar estratégias de guiamento e/ou orientação.

É bem conhecido que o hipocampo desempenha papel essencial no mecanismo de cognição, sendo fundamental para a localização espacial, como a requerida no teste do labirinto aquático de Morris (PETTENUZZO, 2001).

Diante destes fatos, pode-se inferir que o EHAMa na dose testada e, administrado tanto de forma aguda quanto subcrônica, não compromete a função hipocampal. Olton e Markowska (1994) e Save e Poucet (2000), corroboram com o exposto, pois segundo estes autores o teste do labirinto aquático de Morris é um modelo muito adequado para avaliar a integridade da função do hipocampo.

3.3.3 Teste da Barra giratória

O tratamento dos animais com o EHAMa (600 mg/kg), tanto na administração aguda quanto na subcrônica, não alterou de forma significativa o tempo de permanência dos animais sobre a barra giratória, em comparação com o grupo controle (figuras 08 e 09). Almeida e colaboradores (2014), encontraram resultado semelhante para a espécie *M. sylvatica*, pois verificaram que o extrato aquoso desta espécie, não comprometeu a atividade locomotora dos animais.

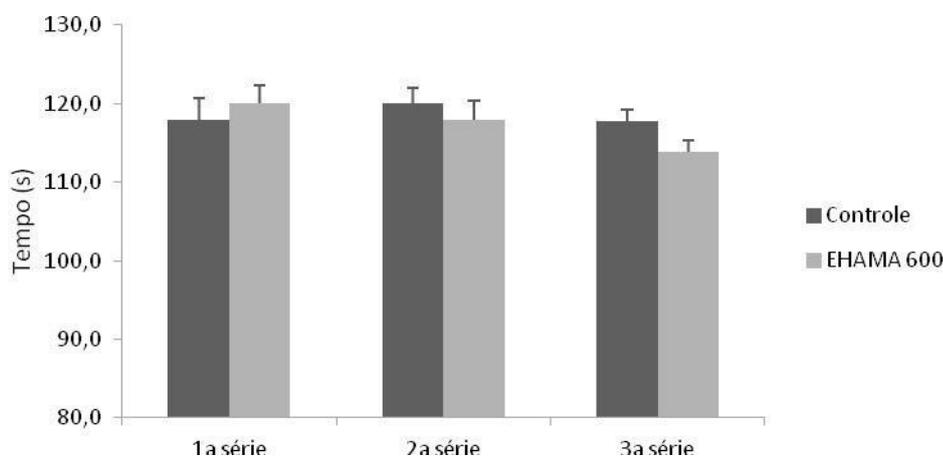


Figura 08: Efeito da administração aguda do EHAMA no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória. EHAMA = extrato hidroalcoólico de *Myrcia amazonica*. Os valores representam a média \pm erro padrão.

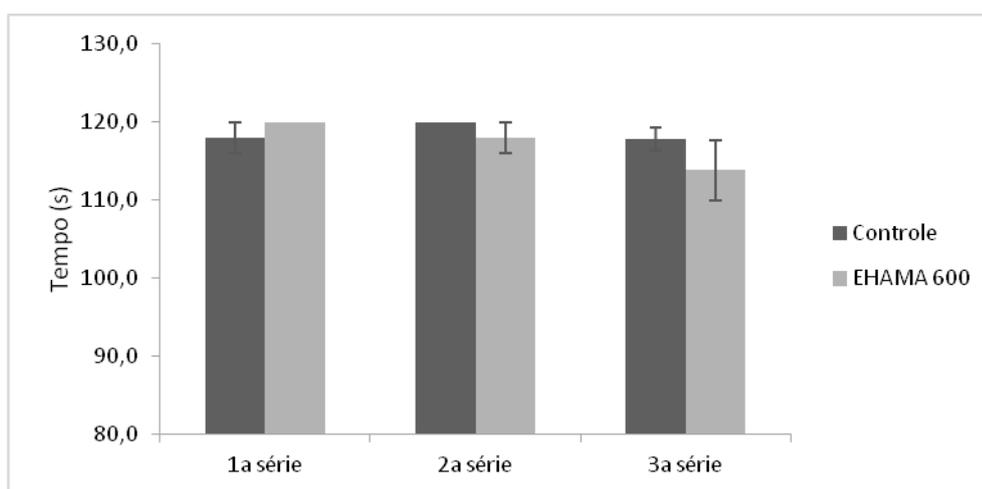


Figura 09: Efeito da administração subcrônica do EHAMA no desempenho de ratos Wistar submetidos ao teste da barra giratória. EHAMA = extrato hidroalcoólico de *Myrcia amazonica*. Os valores representam a média \pm erro padrão.

O teste da barra giratória avalia a integridade da função motora dos animais, verificando efeitos como incoordenação e relaxamento muscular, os quais podem ser induzidos por drogas depressoras do SNC (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

Os resultados obtidos no teste indicaram que a administração do EHAMa nas condições testadas não causou incoordenação motora nos animais, seja por sedação e/ou relaxamento muscular. Dessa forma, supõe-se um baixo potencial neurotóxico da espécie, levando-se em consideração que em nenhum dos testes comportamentais foi verificada alguma alteração indicativa de neurotoxicidade.

3.3.4 Avaliação da hepatotoxicidade

O tratamento por 21 dias consecutivos com o EHAMa (600 mg/kg) mostrou diferença significativa nos níveis séricos da enzimas alanina aminotransferase (ALT) de ratos Wistar em comparação com o grupo controle (tabela 02). Essa diferença está relacionada a uma diminuição causada pelo EHAMa (600 mg/kg) nos níveis dessa enzima podendo assim sugerir um possível efeito hepatoprotetor. Os níveis da enzima aspartato aminotransferase (AST) não mostrou diferença significativa quando comparada ao grupo controle, diante disso pode-se inferir a ausência de hepatotoxicidade do EHAMA na dose de 600 mg/kg.

Tabela 02: Níveis das enzimas alanina aminostransferase (ALT) e asparto aminostransferase (AST) em soro de ratos Wistar

Tratamentos	Enzima ALT (U/mL)	Enzima AST (U/mL)
Controle	60,4±3,4	106,8±4,9
EHAMa 600 mg/kg	39,5±3,5**	83,9±3,2

EHAMa = extrato hidroalcoólico de *Myrcia amazonica*. Os valores estão expressos como média ± erro padrão. ANOVA seguida de Teste de Tukey. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$; *** $p \leq 0,001$ em relação ao grupo controle.

O fígado é o principal órgão envolvido na biotransformação de drogas. Os níveis séricos de algumas enzimas, como ALT, AST são parâmetros valiosos utilizados como indicadores de doenças hepáticas (KASMANI *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012). O aumento nos níveis destas enzimas no soro estão associados com a toxicidade no fígado pelas drogas ou qualquer outra hepatotoxina (RAMAIAH, 2011).

Embora a enzima AST seja considerada um indicador de lesão hepática, a mesma não é tão específica para o fígado, uma vez que também está presente em outros órgãos, como coração, rins e pâncreas (AL-HABORI, 2002; OZER *et al.*, 2008). No entanto, a ALT é

primariamente limitada ao citosol dos hepatócitos, sendo, portanto, considerada um indicador altamente sensível para detecção de danos hepatocelulares (AL-HABORI, 2002, RAMAIAH, 2011). Em estudos pré-clínicos de rotina, ALT em combinação com AST são usados para confirmar a lesão hepatocelular (RAMAIAH, 2011).

No presente estudo, a exposição dos animais ao EHAMa durante 21 dias provocou uma diminuição significativa nos níveis da enzima ALT, o que fornece evidências de que o extrato hidroalcolico de *M. amazonica* possa ter propriedade hepatoprotetora.

4. CONCLUSÃO

- O extrato hidroalcolico a 65% das folhas de *M. amazonica* na dose de 600 mg/kg possui propriedade antiedematogênica e antinociceptiva, o que confirma o potencial terapêutico desta espécie e justifica em parte seu uso na medicina popular. Tal propriedade pode ser atribuída à presença de flavonoides. No entanto, mais investigações são necessárias para determinar os princípios ativos e estabelecer os mecanismos de ação envolvidos nessa atividade farmacológica.
- O tratamento por via oral, tanto agudo quanto subcrônico, com o EHAMa, não provocou alterações sobre o peso corporal, a memória e aprendizagem e locomoção de ratos Wistar, demonstrando que o mesmo não causa efeitos tóxicos na dose testada.
- A administração por 21 dias com o EHAMa provocou alterações significativas nos níveis da enzima alanina aminotransferase, diminuindo os níveis séricos desta enzima quando comparado com o grupo controle, indicando que o tratamento subcrônico com o EHAMa pode causar um possível efeito hepatoprotetor.
- Tais resultados fornecem uma base científica para aplicação terapêutica desta espécie na medicina tradicional, haja vista que estudos farmacológicos e toxicológicos são de extrema importância para a comprovação da segurança e eficácia de compostos terapêuticos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEOYE, B.A.; OYEDAPA, O.O. Toxicity of *Erythrophleum guineense* stem-bark: role of alkaloidal fraction. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 45–54, 2004.
- ALBU, S.; JOYCE, E.; PANIWNKY, L.; LORIMER, J.P.; MASON, T.J. Potential for the use of ultrasound in the extraction of antioxidants from *Rosmarinus officinalis* for the food and pharmaceutical industry. **Ultrasonic Sonochemistry**, v. 11, p. 261-266, 2004.
- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves: a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, p. 209–217, 2002.
- ALMEIDA, E. R. Plantas medicinais brasileiras: conhecimentos populares e científicos. São Paulo: Hemus. 1993.
- ALMEIDA, M. R. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC.** 76 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia. Área de Concentração: Bioprospecção e Manejo de Recursos Naturais da Amazônia - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, Santarém, 2014.
- ALMEIDA, M. Z. **Plantas Mediciniais**. 3. ed. Salvador : EDUFBA, 2011.
- ALMEIDA, N.A.S. Espécies de *Myrcia* (Myrtaceae) nativas da região de Santarém-Pará. 2009. 73f. **Trabalho de Conclusão de Curso** (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) Universidade Federal do Pará – Campus de Santarém, Santarém, 2009.
- ALOMAR, M. J. Factors affecting the development of adverse drug reactions (Review article). **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 22, p. 83–94, 2014.
- AMENYA, H. Z.; GATHUMBI, P. K.; MBARIA, J. M.; THAIYAH, A. G.; THOITHI, G. N. Sub-acute toxicity of the chloroformic extract of *Rapanea melanophloeos* (L.) Mez in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 154, p. 593–599, 2014.
- ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. Myrtales. Mirtaceae. Disponível em <http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>. Acesso em 10 dez. 2014.
- APRILE, F. M.; SIQUEIRA, G. W. Etnoconhecimento e cultivo de plantas medicinais. Curitiba, **CRV**, 2012.
- ARAÚJO, E. J. F. Estudos pré-clínicos da neurotoxicidade da fração rica em casearinas isolada das folhas da *Casearia sylvestris* Swartz. 2013. 101 fls. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2013.
- AURICCHIO, M. T., e BACCHI, E. M. – Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga): Revisão. **Rev.Inst. Adolfo Lutz**, 62(1): 55 - 61 ,2003.

- BAHAMONDE, S. M. A.; FLORES, M. L.; CÓRDOBA, O. L.; TAIRA, C. A.; GORZALCZANY, S. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of an aqueous extract of *Chiliodendron bichthyonum*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, p. 699-705, 2013.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 922-1000, 2010.
- BARA, M. T. F. et al./Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(3), 59-69, 2009.
- BARBOSA, W. L. R. (org.) et al. **Etnofarmácia**: fitoterapia popular e ciência farmacêutica. Belém, NUMA/UFPA, 2009.
- BARREIRO, E. J.; FRAGA, C. A. M.; Quim. Nova 1999, 22, 744
- BASBAUM, A.I., BAUTISTA, D.M., SCHERRER, G., JULIUS, D. **Cellular and Molecular Mechanisms of Pain**. Cell, v. 139, p. 267-284. 2009.
- BAUHMANN, H.; GAULDIE, J. The acute phase response. **Immunol. Today**, v. 15, p. 7480, 1994.
- BERTOLINI, G.R.F; MATOS, C.M.P; ARTIFON, E.L; FERRARI, D; VITURI, R.F. Avaliação Funcional da Nocicepção do Joelho em Ratos Tratada com laser de baixa potência e natação. **Rev Bras Med Esporte**. Vol.17, n.1. São Paulo. 2011
- BESSON, J. M. **The neurobiology of pain**. The Lancet. V.353, n.9164, p.1610–15. 1999
- BLANE, G. F. Blokade of bradikinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. **J. Pharmacol.**, v. 19, p. 367-373, 1967.
- BORHAN, M. Z.; AHMAD, R.; RUSOP, M.; ABDULLAH, S. Optimization of ball milling parameters to produce *Centella asiatica* herbal nanopowders. **Journal Of Nanostructure in Chemistry**, v. 3, p. 1-8, 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Decreto nº 45.502, de 27 de fevereiro de 1959. Aprova Farmacopeia Brasileira, 2ª edição e dá outras providências. 1959.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 49, de 23 de novembro de 2010. Aprova Farmacopeia Brasileira, 5ª edição e dá outras providências. 2010. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm> Acesso em: 20 out. 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131–134, 2005.

CALIXTO, J. B.; BEIRITH, A.; FERREIRA, J.; SANTOS, A. R. S.; FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401–418, 2000.

CARMONA, F.; PEREIRA, A. M. S. Herbal medicines: old and new concepts, truths and misunderstandings. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, n. 2, p. 379-385, 2013.

CARNEVALE, G.; DI VIESTI, V.; ZAVATTI, M.; ZANOLI, P. Anxiolytic-like effect of *Griffonia simplicifolia* Baill. seed extract in rats. **Phytomedicine**, v. 18, p. 848–851, 2011.

CARVALHO, A. C. B. Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies vegetais oficializadas no Brasil. **Tese** (Doutorado em Ciências da Saúde). Universidade de Brasília, Brasília, 318 p., 2011.

CARVALHO, A. C. B.; SANTOS, L. A.; SILVEIRA, D. Systematic organization of medicinal plant information: a monograph template proposal. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 24, p. 80-88, 2014.

CARVALHO, L. M.; COSTA, J. A. M.; CARNELOSSI, M. G. **Qualidade em plantas medicinais**. Aracaju: Embrapa Tabuleiros Costeiros, 2010. (Documentos / Embrapa Tabuleiros Costeiros). Disponível em: http://www.cpatc.embrapa.br/publicacoes_2010/doc_162.pdf. Acesso em: 21 out. 2014.

CERQUEIRA, M. D., SOUZA-NETA, L. C., GUEDES, M. L. S.; RIVELINO, R.; CRUZ, F. G. Myrciaine, a new nicotinic ester from *Myrcia blanchetiana* (Myrtaceae). **Tetrahedron Letters**, v. 54, p. 1421–1423, 2013.

CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **J. Braz. Chem. Soc.** 18, 998, 2007.

CESARE, P.; McNAUGHTON, P. Peripheral pain mechanisms. **Curr. Opin. Neurobiol.** v.7, p.493-499. 1997.

CHABARIBERI, R. A. O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonoides das folhas de *Maytenus* (Celastraceae) e de *Passiflora* (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHAPMAN, C. R.; GAVRIN, J. **Suffering: the contributions of persistent pain**. The Lancet., v. 353, n. 9171, p. 2233-2237. 1999

COELHO-FERREIRA, M. Medicinal knowledge and plant utilization in an Amazonian coastal community of Marudá, Pará State (Brazil). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 159175, 2009.

COLLIER, H. O. J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Braz. J. Pharmacol. Chemother.**, v. 32, p. 295-310, 1968.

COROAD-ARTAL, F. J. Síndromes neurológicas asociados con el consumo de plantas y hongos con componente tóxico (I). Síndromes neurotóxicos por ingesta de plantas, semillas y frutos. **Revista de neurologia**, v. 36, n.9, p. 860-871, 2003.

COSTA, P. R. R.; Quim. Nova 2002, 25, 74. 2002

CRUZ, A.V.M.; KAPLAN, M.A.C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, 11: 47-52, 2004.

DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition

DE BRUYNE, T.; PIETERS, L.; DEELSTRA, H. ; VLIETINCK, A.J. Condensed vegetable tannins: biodiversity in structure and biological activities. **Biochemistry and Systematic Ecology**, v. 27, p. 445-459, 1999.

DEBBIE, S. *et al.* Pharmacovigilance of herbal medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 513-518, 2012.

DI STASI, L. C.; **Plantas Medicinais: arte e ciência – guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Editora UNESP, 230 p. 1996.

DIAS, S. **A versão biológica da dor**. Com Ciência, 2007. n.87. Reportagem. Disponível em: <<http://www.comciencia.br/comciencia/?section=8&edicao=24&id=274&tipo=0>>, Acesso em: 15 de dezembro de 2014.

DONATO, A. M.; MORRETES, B. L. Estudo anatômico das folhas de *Psidium 2011* DUFRENSE, C.J. & FARNWORTH, E.R. A review of latest research findings on health promotion properties of tea. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 12, p. 404-421, 2001.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detection neurological deficit in rats a mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, p. 208209, 1957.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T. A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ETHUR, L.Z. *et al.* Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui - RS. **Rev. bras. plantas med.**, Botucatu, v. 13, n. 2, 2011.

EZEJA, M. I.; ANAGA, A. O.; ASUZU, I. U. Acute and sub-chronic toxicity profile of metanol leaf extract of *Gouania longipetala* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 1155–1164, 2014.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, 2004. p. 263-288.

FARINA, M.; ROCHA, J.B.T.; ASCHNER, M. Mechanisms of methylmercury-induced neurotoxicity: Evidence from experimental studies. **Life Sciences**, v. 89, p. 555–563, 2011.

Farmacognosia = Brazilian Journal of Pharmacognosy, v. 15, n. 3, p. 191-194, jul./set. 2005.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Fascículo II. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 2002.
Bara, M. T. F. et al./Revista Eletrônica de Farmácia Vol 6(3), 59-69, 2009.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte 2. Fascículo I. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte 2. Fascículo V. São Paulo: Atheneu Editora LTDA, 2003.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions**, v. 32, p. 283-288, 1991.

FIRMO, W. C. A. MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G.; Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisas**, v. 18, n. especial, 2011.
FRANCO, J.; NAKASHIMA, T.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e 2005

FRANCO, M.; MONTENEGRO, M. R.; BRITO, T. BACCHI, C. E.; ALMEIDA, P. C. **Patologia: processos gerais**. 5ª Ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2010. 331p.

FUNCH, L. S.; LANDRUM, L. R.; OLIVEIRA, M. I. U.; PROENÇA, C. E. B.; MAZINE, F. F.; ROSÁRIO, A. S. Myrtaceae. In: GIULIETTI, A. M; RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, J. M. C. (Ed.). *Plantas Raras do Brasil*. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. p.289-292.

FÜRST, R.; ZÜNDORF, I. Plant-derived anti-inflammatory compounds: hopes and disappointments regarding the translation of preclinical knowledge into clinical progress. **Mediators of Inflammation**, p.1-9, 2014.

GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; MARTÍNEZ, J. A. Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. **Inflammation Research**, v. 58, p. 537–552, 2009

GOVAERTS, R.; SOBRAL, M.; ASHTON, P.; BARRIE, F.; HOLST, B. K.; LANDRUM, L. L.; MATSUMOTO, K.; MAZINE, F. F. LUGHADHA, E. N.; PROENÇA, C.; SOARESSILVA, L. H.; WILSON, P. G.; LUCAS, E. *World Checklist of Myrtaceae*. Kew: Royal Botanic Gardens, 2008.

GRESSLER, E. , PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasil. Bot.**, v.29, n.4, p.509-530, out./dez. 2006

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicine: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p. 205-215, 1996.

HECHT, S.M. Biologically active extracts from *Myrcia fallax* (Myrtaceae) Peru and 1984

HOSSEINZADEH, H.; YOUNESI, H.M. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Crocus sativus* L. stigma and petal extracts in mice. **BMC Pharmacology**, v. 2, n. 7, 2002.

IEDA Y., WAGURI-NAGAYA Y., IWAHASI T., OTSUKA T., MATSUI N, NAMBA M, ASAI K., KATO T.; IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases and gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (GLS/PD-ECGF) in a chondrosarcoma cell line (OUMS-27). **Rheumatol. Int.**, v. 21, p. 45-52, 2001.

JORGE, L. I. F.; AGUIAR, J. P. L.; SILVA, M. L. P.; Anatomia foliar de pedra-hume-caá (*Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianensis*, *Eugenia punicifolia* – Myrtaceae). **Acta Amazônia**, Manaus, v. 30, p. 49-57, 2000.

KASMANI, F. B.; TORSHIZI, M. A. K.; ALLAMEH, A.; SHARIATMADARI, F. A novel aflatoxin-binding *Bacillus* probiotic: Performance, sérum biochemistry, and immunological parameters in Japanese quail. **Poultry Science**, v. 91, p. 1846–1853, 2012.

KIM, H. P.; SON, K. H.; CHANG, W. H.; KANG, S. S. Anti-inflammatory Plant Flavonoids and Cellular Action Mechanisms. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 96, p. 229-245, 2004.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412, 1959.

KULINSKY, V. I. Biochemical aspects of inflammation. **Biochem.**, v. 72 (6), p. 733-746, 2007.

LANA, A.C; PAULINO, C.A; GONÇALVES, I.D. Influência dos exercícios físicos de baixa e alta intensidade sobre o limiar de hipernocicepção e outros parâmetros em ratos. **Rev Bras Med Esporte**, v. 12, n. 2, p. 248-54, 2006.

LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L.; The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic and identification keys. **Brittonia**, 1997.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; GODINHO, R. O.; NOGUEIRA, T. C. M. L. **Farmacologia e toxicologia de produtos naturais**. IN: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R (org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p. 247-262.

LARREY, D.; FAURE, S. Herbal medicine hepatotoxicity: A new step with development of specific biomarkers. **Journal of Hepatology**, v. 54, p. 599-601, 2011.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews**, v. 2, p.787-795, 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacol. Rev.**, v. 53, p. 597-652, 2001.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M. E. G.; ZUANAZZI, J. A. S.; MORENO, P. R. H.;

LIMBERGER, R.P. et al.; Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, 2004.

- LIU, X.; CAO, P.; ZHANG, C.; XU, X.; ZHANG, M. Screening and analyzing potential hepatotoxic compounds in the ethanol extract of *Asteris Radix* by HPLC/DAD/ESI-MSn technique. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 68, p. 51–62, 2012.
- LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.
- MAGINA, M. D. A; DALMARCO, E. M; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L.; method of obtaining same. US Patents. US n.4451459. 29 May 1984, Disponível em:
- MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T.A., Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts, **Food Chemistry**, v. 85, p. 231-236, 2004.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: a integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.1-164. 1999.
- MIRANDA, F.G.G., ALVES, I.A.N, VILAR, J.C., BATISTA, J.S., ANTONIOLLI, A.R./ Toxidade aguda e atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Tabebula avellanedae* Lor. Ex Griseb. **Revista Brasileira de Farmacologia**. Vol. 12, p. 91-94, 2002.
- MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies I: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v. 72, p. 137-147, 1987 a.
- MOLE, S.; WATERMAN, P. G. A critical analysis of techniques for measuring tannins in ecological studies II: techniques for chemically defining tannins. **Oecologia**, v.72, p. 148-156, 1987 b.
- 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.
- MOREIRA, D. L. *et al.* Traditional use and safety of herbal medicines. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, p. 248-257, 2014.
- MORI, S.A.; BOOM, B.M.; CARVALHO, A.M.; SANTOS, T.S.; Ecological importance of Myrtaceae in an eastern Brazilian wet forest. **Biotropica**, 1983.
- MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.
- MORRIS, M. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. **Journal Neuroscience Methods**, v. 11, p. 47-60, 1984.
- MORS, W.B.; GRUNE, U. *Myrcia sphaerocarpa* DC. Planta diabética. In: Simpósio De Plantas Medicinais Do Brasil, Escola Paulista de Medicina, São Paulo. p.72. 1978

MOTA, T.H.S.; DE SOUZA, S.R.; SANTOS, A.P.; CUNHA, C.R.M. Estudo farmacognóstico das folhas da *Sterculia Striata* St. Hil. Et. Naid., coletadas em Itapuranga-Go. **Revista Faculdade Montes Belos (FMB)**, v. 7, n° 1, 2014, p (34-68), 2014.

N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 18, n.5, p. 998-1003, 2007.

NAKAMURA, M. J. *et al.* Essential oils of four Myrtaceae species from the Brazilian southeast. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 38, p. 1170–1175, 2010.

NEWALL, C.A., ANDERSON, L.A., PHILIPSON, J.D., Plantas Mediciniais – guia para profissionais de saúde, São Paulo: Ed. Premier, 2002.

NODARI, R. O.; GUERRA, M. P. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª Ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora da UFSC, 2010.

NOVAIS, T.S. et al.; Atividade antibacteriana em alguns extratos de vegetais do semi-árido brasileiro. **Rev. Bras. Farmacognosia**, São Paulo, v. 13, n. 2, p. 5-7, 2003.

OLINDA, A.C.C. **Estudo da atividade antinociceptiva de um novo fator extraído do veneno de *Crotalus durissus collilineatus***. Dissertação (Mestrado em Fisiologia). Universidade Estadual do Ceará. 2010.

OLIVEIRA, R. B; NASCIMENTO, M. V. M.; VALADARES, M. C.; PAULA J. R.; COSTA, E. A.; CUNHA, L. C. Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium umbellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, n. 3, 2008.

OLTON, D. S.; MARKOWSKA, A. L. Memory and hippocampal function as targets for neurotoxic substances. **Neurotoxicology**, v. 14, p. 439-443, 1994.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Quality control methods for herbal materials. Geneva, **World Health Organization**, 2ª ed., 173 p., 2011.

OZER, J.; RATNER, M.; SHAWC, M.; BAILEY, W.; SCHOMAKER, S. The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity. **Toxicology**, v. 245 p. 194–205, 2008.

Paulista de Medicina, p. 72. 1978.

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO-BAISCH, A. L. O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **Vittalle**, v. 19, n.1, p. 35-44, 2007.

PEREIRA, C. B.; MARIN, A.; MAKI, T. D. T.; NECCHI, R. M. M.; MANFRON, M. P. Physicochemical quality control and dosage of total polyphenols, flavonoids of *Morus Alba* Leaves (Moraceae). **Saúde (Santa Maria)**, v.37, n.2, p. 57-68, 2011.

PETTENUZZO LF. Efeito da administração crônica pós-natal dos ácidos propiônicos e metilmalônico sobre o comportamento de ratos no labirinto aquático de Morris (Water Maze) e sobre alguns parâmetros bioquímicos de estresse oxidativo em hipocampo. [Dissertação]. Porto Alegre: Instituto de Ciências Básicas de Saúde. Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2001.

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

PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 5, 1978, São Paulo. **Anais**. São Paulo: Escola

PORTH, C. M.; MATFIN, G. **Fisiopatologia**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 911p. IN: PORTH, C. M.; SOMMER, C. Inflamação, reparo tecidual e cura de feridas, p. 389-411.

RAJARAMAN, G.; CHEN, J.; CHANG, T. K. H. Ginkgolide A contributes to the potentiation of acetaminophen toxicity by *Ginkgo biloba* extract in primary cultures of rat hepatocytes. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 217, p. 225–233, 2006.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug- induced liver injury. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31 p. 161–172, 2011.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RATHEE, P.; CHAUDHARY, H.; RATHEE, S.; RATHEE, D.; KUMAR, V.; KOHLI, K. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review. **Inflammation & Allergy - Drug Targets**, v. 8, p. 229-235, 2009.

RODRIGUES, H. G. *et al.* Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.

ROSA, P.S.S.S; **Atividade antimicrobiana, *in vitro*, do extrato aquoso de cinco espécies da família Myrtaceae coletadas na região de Santarém, PA**; 51 f. Trabalho de conclusão de curso (Licenciatura plena em Ciência Biológicas). Universidade Federal do Pará, Santarém, 2007.

ROSA, P. O.; **O gênero *Myrcia* DC. (Myrtaceae) nos campos rupestres de Minas Gerais**; 84 f. Tese (Mestrado em Ecologia e conservação de Recursos Naturais). Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2009.

SILVA, L.A.; **Composição química e atividades antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de *Myrcia sylvatica* (G.Mey.) DC. coletada em Santarém-Pará**. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) Universidade Federal do Oeste do Pará, Santarém, 2015.

- ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S. Sinopse das espécies de *Marlierea* Cambess. (Myrtaceae) na Amazônia brasileira. **Acta Amazonica**, v.36, n.1, p.37-52. 2006
- ROSÁRIO, A. S.; SECCO, R. S.; SILVA, J. B. F. Notas sobre *Ugni* Turcz (Myrtaceae) na Amazônia Brasileira. **Acta Amazonica**, v.34, v.13, n.1, p.43-51, 2011. n.1, p.139-141. 2004.
- SALEH, I. A.; KAMAL, S. A.; SHAMS, K. A.; ABDEL-AZIM, N. S.; ABOUTABL, E. A.; HAMMOUDA, F. M. Effect of particle size on total extraction yield and silymarin content of *Silybum marianum* L. seeds. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 803-809, 2015.
- SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829-838, 1996.
- SALVETTI, M. G. S.; PIMENTA, C. A. M. Dor crônica e a crença de auto-eficácia. **Revista da Escola de Enfermagem da USP**, v. 41, n. 1, p. 135-40, 2007.
- SAVE, E.; POU CET, B. Involvement of the hippocampus and associative parietal cortex in the use of proximal and distal landmarks for navigation. **Behavioural Brain Research**, v. 109: p. 195–206, 2000.
- SCHAPOVAL, E. E. S.; HENRIQUES, A. T. Biological activities and essential oil
- SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385–405, 2004.
- SIEGMUND, E.; CADMUS, R.; LU, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 95, p. 729, 1957.
- SILVA, F. K. S. **Sinopse e composição química dos óleos essenciais de espécies de Myrtaceae comercializadas como pedra-ume-caá em Belém-Pará**. 2012. 72 fls. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal Rural da Amazônia: Belém, 2012.
- SILVA, P. **Farmacologia**. 8ªed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013, 1325p.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: A necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n.1, p. 35-40, 2002.
- SIQUEIRA JR., J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. Rio de Janeiro: MEDSI, 238 p. 2000.
- 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.
- SMELTZER, Suzanne C. et al. BRUNNER & SUDDARTH: **Tratado de Enfermagem médico-cirúrgica**/ revisão técnica Isabel Fonseca da Cruz, Ivone Evangelista Cabral; tradução Fernando Diniz Mundim, José Eduardo Ferreira de Figueiredo]. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanarara Koogan, 2009.

SMITH, N. *et al.* **Flowering plants of Neotropics**. Princeton: Princeton University Press, 2004.

SOBRAL, M.; PROENÇA, C.; SOUZA, M.; MAZINE, F.; LUCAS, E. *Myrtaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB171>. Acesso em: 14 Set. 2015.

SOUZA FILHO, A.P.S. *et al.* Potencial alelopático de *Myrcia guianensis*. **Planta daninha**, v. 24, n. 4, Dec. 2006.

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

TJOLSEN, A.; HOLE, K. Animal Models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. **The pharmacology of Pain**, V. 130/I, Springer: Verlag, p. 1-20, 1997.

USP, Revista. São Paulo, n.89, p. 114-133, março/maio 2011

VEIGA JÚNIOR, V. F; PINTO, A. C. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n.3, p. 519-528, 2005.

VENANCIO, A.M. Toxicidade aguda e atividade antinociceptiva do óleo essencial do *Ocimum basilicum* L. (manjeriço), em *Mus musculus* (camundongos). Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal de Sergipe, Aracaju, 2006.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with Serankottai nei, a siddha drug–milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 69, p. 9 15, 2000.

VYKLICKY, L. Techniques for the study of pain in animals. **Adv. Pain Res. Ther.**, v. 3, p.727–745, 1979.

WANG, Y.; CHEN, P.; TANG, C.; WANG, Y.; YAZHEN, L.; ZHANG, H. Antinociceptive and anti-inflammatory of extracts and two isolates flavonoids of *Carthamus tinctorius* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, p. 944-950, 2014.

WHISHAW, I. Q., e MITTLEMAN, G. Visits to start, routes and places by rats (*Rattus norvegicus*) in swimming pool navigation tasks. **Journal of Comparative Physiology**, v.100, p. 422-431. 1986

WHO, World Health Organization, Monographs on selected medicinal plants, v. 2, Geneva, 2002.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carragenin-induced edema in haind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544– 547, 1962.

XU, Q.; WANG, Y.; GUO, S.; SHEN, Z.; WANG, Y.; YANG, L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 540–545, 2014.

XU, Q.; WANG, Y.; GUO, S.; SHEN, Z.; WANG, Y.; YANG, L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 152, p. 540–545, 2014.

XU, Q.; WANG, Y.; GUO, S.; SHEN, Z.; WANG, Y.; YANG, L. Anti-inflammatory and analgesic activity of aqueous extract of *Flos populi*. **Journal of Ethnopharmacology** <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.01.037i>. (2014)

ZUANAZZI, J. A. S. & MONTANHA, J.A. Flavonóides. In SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da Planta ao Medicamento*. 5. ed. Porto Alegre: RS. Editora da UFSC, 2005.