

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

TATIANE BEZERRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO E DA TOXICIDADE (AGUDA E SUBCRÔNICA) DAS
FOLHAS DE *Miconia prasina* (Sw.) DC. EM ROEDORES**

Recife – PE

2017

TATIANE BEZERRA DE OLIVEIRA

**ESTUDO FARMACOLÓGICO E DA TOXICIDADE (AGUDA E SUBCRÔNICA) DAS
FOLHAS DE *Miconia prasina* (Sw.) DC. EM ROEDORES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, Área de concentração – Biologia Química para a Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife – PE

2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Oliveira, Tatiane Bezerra de
Estudo farmacológico e da toxicidade (aguda e subcrônica) das folhas de *Miconia prasina* (Sw.) em roedores. / Recife: O Autor, 2017.

144 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Química para a Saúde, Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos

1. Fitoquímicos 2. Melastomataceae 3. Fenóis I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orient.) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017- 573

TATIANE BEZERRA DE OLIVEIRA

Título: ESTUDO FARMACOLÓGICO E DA TOXICIDADE (AGUDA E SUBCRÔNICA) DAS FOLHAS DE *Miconia prasina* (Sw.) DC. EM ROEDORES.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 17/02/2017

BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva – CB/UFPE (Orientadora)

Titulares:

Prof. Dr. Sebastião José de Melo – CB/UFPE

Profa. Dra. Maria Bernadete de Sousa Maia – CB/UFPE

Dr. Thiago Antônio de Sousa Araújo

Dra. Isla Vanessa Gomes Alves Bastos - RENORBIO

Suplentes:

Profa. Dra. Silene Carneiro do Nascimento – CB/UFPE

Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar – CB/UFPE

Dedicatória

Dedico esta conquista, aos meus pais e minha
irmã que me ensinaram a sempre buscar os
meus sonhos sem ter medo das dificuldades e
frustrações que possa ter pela frente.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser meu sustento de todas as horas, e por proporcionar todos os meus dias, para que eu possa alcançar os meus objetivos.

A minha orientadora Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva pelos valiosos ensinamentos, pela confiança e incentivo.

Ao Prof. Dr. Ranilson de Souza Bezerra, coordenador da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e oportunidade.

A Adenilda Eugenia de Lima, secretária da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo suporte e dedicação.

A Profa. Dra. Jaciana dos Santos Aguiar, pela amizade, apoio e incentivo.

Aos Professores Dr. Jeymersson Raphael Cardoso Vieira e Dr. Danyel Elias da Cruz Perez, pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

A Profa. Dra. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim e aos pós-graduandos do Laboratório de Produtos Naturais (LAPRONAT) pela colaboração para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do BIOFARMATOX que me ajudaram direta ou indiretamente.

Ao funcionários do departamento de antibióticos pelo suporte.

A toda minha família, pelo amor, cuidado e compreensão.

Ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

**“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não
é senão uma gota de água no mar. Mas o mar
seria menor se lhe faltasse uma gota.”**

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO

As plantas são fontes riquíssimas de compostos candidatos a novos medicamentos. Entretanto, apenas uma pequena fração das espécies conhecidas de plantas foram investigadas quanto a suas atividades farmacológicas e toxicológicas. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos farmacológicos e toxicológicos dos extratos hexânico (EHMP), acetato de etila (EAMP) e metanólico (EMMP) das folhas de *Miconia prasina* (Sw.) DC. O perfil fitoquímico dos extratos foram investigados por cromatografia em camada delgada (CCD) e a determinação do teor metabólitos secundários. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH[•], ABTS⁺, método de fosfomolibdênio e método de redução de ferro (FRAP). Os modelos experimentais *in vivo* utilizaram camundongos albinos swiss (machos e fêmeas) e ratos albinos wistar (machos). A toxicidade aguda foi determinada pela administração oral dos extratos EHMP, EAMP e EMMP (2000 mg/kg, v.o.) e observados os parâmetros fisiológicos e comportamentais. A avaliação da atividade anti-inflamatória foi realizada pelos modelos experimentais de bolsão de ar induzido por carragenina com posterior determinação de citocinas, edema de pata induzidos por carragenina e permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético. Os resultados obtidos nos experimentos antioxidantes e anti-inflamatórios direcionaram a escolha do EMMP para avaliação da atividade hepatoprotetora em modelo de lesão hepática induzida por acetaminofeno (250 mg/kg, v.o.) e para avaliação da toxicidade subcrônica. O estudo do perfil fitoquímico detectou a presença de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, terpenos, cumarinas e taninos nos extratos de *M. prasina*. EMMP mostrou elevado teor de compostos fenólicos totais ($139,3 \pm 8,69$ mg EAT/g), enquanto que EHMP e EAMP mostraram maior níveis de cumarinas ($470,29 \pm 0,45$ mg EC/g) e flavonoides ($287,31 \pm 5,58$ mg ER/g), respectivamente. Nos testes antioxidantes, verificou-se maior capacidade de sequestro de radicais livres e redução de ferro para EMMP. Os extratos de *M. prasina* na dose de 2000 mg/kg não induziu mudanças nos parâmetros fisiológicos observados (consumo de água, ração e ganho de peso). Os extratos de *M. prasina* reduziram a migração celular para o bolsão de ar nas doses 30, 100 e 300 mg/kg. EHMP, EAMP e EMMP obtiveram a melhor inibição na dose de 300 mg/kg (68%, 69% e 74%, respectivamente) e também reduziram os níveis de IL-1 β no exsudato do bolsão. EAMP e EMMP reduziram o volume do edema de pata e inibiram o aumento da permeabilidade vascular. No modelo de hepatoproteção, EMMP não reduziu os níveis plasmáticos de ALT, AST e fosfatase alcalina, nem impediu alterações histopatológicas associadas à hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno. Apesar de não possuir atividade hepatoprotetora, EMMP não foi hepatotóxico quando administrado por 7 dias

na dose de 300 mg/kg (grupo satélite sem acetaminofeno). Os resultados demonstram que a administração subcrônica do EMMP em geral apresentou baixa toxicidade por não induzir mortalidade ou alterações nos parâmetros fisiológicos. No entanto, as doses de 100 e 300 mg/kg reduziu o número de leucócitos polimorfonucleares e produziu alterações estruturais no fígado e nos rins quando administrada oralmente durante 30 dias. Em conclusão, os extratos de *M. prasina* apresentam baixa toxicidade e potencial farmacológico antioxidante e anti-inflamatório.

Palavras-chave: Melastomataceae. Mandapuça-branco. Apaga-brasa. Sabiazeira. Antioxidante. Compostos fenólicos. Anti-inflamatório.

ABSTRACT

Plants are a rich sources of compounds that are candidates for new medicines. However, only a small fraction of plants species were investigated for their pharmacological and toxicological activities. The aim of the present study was to evaluate the pharmacological and toxicological effects of the extracts hexane (EHMP), ethyl acetate (EAMP) and methanolic (EMMP) of *Miconia prasina* (Sw.) DC leaves. The phytochemical profile of the extracts were investigated by thin-layer chromatography and determination of the secondary metabolites content. The antioxidant activity was evaluated by the methods DPPH •, ABTS⁺, phosphomolybdenum and ferric reduction ability of plasma (FRAP). In vivo experimental models used albino swiss mice (male and female) and albino wistar rats (males). Acute toxicity was assessed by oral administration of EHMP, EAMP and EMMP extracts (2000 mg / kg, v.o.) and assessment of physiological and behavioral parameters. The evaluation of the anti-inflammatory activity were used the experimental models of air pouch induced by carrageenan with subsequent determination of cytokines, paw edema induced by carrageenan and vascular permeability induced by acetic acid. The results obtained in the antioxidant and anti-inflammatory experiments directed the choice of EMMP to evaluate hepatoprotective activity in hepatic injury induced by acetaminophen (250 mg / kg) and assessment of subchronic toxicity. The phytochemical profile detected the presence of alkaloids, anthraquinones, flavonoids, terpenes, coumarins and tannins in extracts of *M. prasina*. EMMP showed a high content of phenolic compounds (139.3 ± 8.69 mg TAE/g), whereas EHMP and EAMP showed higher levels of coumarins (470.29 ± 0.45 mg CE/g) and flavonoids (287.31 ± 5.58 mg RE/g), respectively. In the antioxidant tests, it was verified a greater capacity of free radical sequestration and reduction of iron for EMMP. Treatment with extracts of *M. prasina* at the dose of 2000 mg/kg did not induce changes in the observed physiological parameters (weight gain, feed and water consumption). The extracts of *M. prasina* reduced cell migration for the air pouch at doses 30, 100 and 300 mg/kg. EHMP, EAMP and EMMP showed the best inhibition at the dose of 300 mg / kg (68%, 69% and 74%, respectively) and reduced IL-1 β levels in the air pouch exudate. In paw edema and vascular permeability models, EAMP and EMMP reduced the volume of paw edema and inhibited the increase of vascular permeability. In the hepatoprotective model, EMMP did not reduce plasma levels of ALT, AST and alkaline phosphatase, or prevent histopathological changes associated with hepatotoxicity induced by acetaminophen. Although EMMP does not have hepatoprotective activity, it was not hepatotoxic when administered for 7 days at the dose of 300 mg/kg (group without acetaminophen). The subchronic administration

of EMMP in general presented low toxicity because it did not induce mortality or changes in the physiological parameters. However, at doses of 100 and 300 mg/kg reduced the number of polymorphonuclear leukocytes and produced morphological changes in the liver and kidneys when administered orally for 30 days. In conclusion, extracts of *M. prasina* have low toxicity and pharmacological potential antioxidant and anti-inflammatory.

Keywords: Melastomataceae. Mandapuçá-branco. Apaga-brasa. Sabiazeira. Antioxidant. Phenolic compounds. Anti-inflammatory.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Componentes da inflamação aguda e crônica.	21
Figura 2 – Metabolismo do Ácido Araquidônico na inflamação.	24
Figura 3 – <i>Miconia prasina</i> (Sw) DC.	36
Figura 4 – Substâncias isoladas de <i>Miconia prasina</i> (Sw) DC.	37
Figura 5 – Fluxograma do método de extração.	38
Figura 6 – Efeito dos extratos de <i>M. prasina</i> sobre os níveis de citocinas no exsudato inflamatório.	52
Figura 7 – Efeito do EAMP sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1%.	54
Figura 8 – Efeito do EMMP sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1%.	55
Figura 9 – Efeito da toxicidade hepática induzida por acetaminofeno em camundongos.	57
Figura 10 – Efeito da administração oral EMMP sobre o consumo de ração e água.	59
Figura 11 – Peso corporal médio de camundongos machos e fêmeas administrados com EMMP durante 30 dias.	60
Figura 12 – Fotomicrografia hepática de camundongos tratados com EMMP por 30 dias.	63
Figura 13 – Fotomicrografia de renal de camundongos tratados com EMMP por 30 dias.	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividade biológica e composição química do gênero <i>Miconia</i>	32
Tabela 2 – Sistema de eluição e reveladores utilizados para caracterização de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada.	39
Tabela 3 – Perfil fitoquímico dos extratos de <i>Miconia prasina</i> por CCD.	47
Tabela 4 – Teor de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarina nos extratos de <i>M. prasina</i>	48
Tabela 5 – Atividade antioxidante dos extratos de <i>M. prasina</i> pelos métodos DPPH, ABTS, fosfomolibdênio e FRAP.	49
Tabela 6 – Efeito tóxico da administração oral dos extratos de <i>M. prasina</i>	50
Tabela 7 – Efeito dos extratos de <i>M. prasina</i> sobre parâmetros hematológicos.	50
Tabela 8 – Efeito dos extratos de <i>M. prasina</i> sobre a migração celular em bolsão de ar.	51
Tabela 9 – Efeito de EMMP e EAMP sobre edema de pata em ratos.	53
Tabela 10 – Efeitos de EMMP sobre enzimas hepáticas na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno.	56
Tabela 11 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros hematológicos.	61
Tabela 12 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros bioquímicos.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-HT	5-hidroxitriptamina
ABTS⁺	2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ALT	Alanina aminotransferase
ALP	Fosfatase alcalina
AST	Aspartato aminotransferase
CAT	Capacidade antioxidante total
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEPAN	Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste
COX	Cicloxigenase
COXIBES	AINEs seletivos para a COX – 2
CDDO	Ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11) -dieno-28-óico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EAMP	Extrato acetato de etila de <i>Miconia prasina</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EHMP	Extrato hexânico de <i>Miconia prasina</i>
EMMP	Extrato metanólico de <i>Miconia prasina</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
FRAP	Potencial antioxidante de redução de ferro
GM-CSF	Fator estimulador de macrófagos-granulócitos
GHS	Globally Harmonised System
GSH	Glutationa reduzida
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-18	Interleucina 18
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IgE	Imunoglobulina E
IgM	Imunoglobulina M
IMA-AL	Instituto do Meio Ambiente de Alagoas
IFN-γ	Interferon- γ

LBT₄	Leucotrieno 4
LOX	Lipoxigenase
LTs	Leucotrienos
NAPQI	N-acetil-p-benzoquinonaimina
NEU	Difenilborinato de amino-2etila
NF-κB	Fator de transcrição nuclear-κB
NGF	Fator de crescimento nervoso
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
OECD	Organization for Economic Co-operation and Development
PAF	Fator de ativação plaquetária
PBS	Solução tampão fosfato
PGE₂	Prostaglandina E2
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TXA₂	Tromboxano A2
TPTZ	Complexo Fe ³⁺ /tripiridiltriazina
UV	Ultravioleta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVO ESPECÍFICOS	20
3 REFERENCIAL TEÓRICO	21
3.1 INFLAMAÇÃO	21
3.1.1 Aminas vasoativas	22
3.1.2 Eicosanóides	23
3.1.3 Óxido Nítrico	25
3.1.4 Citocinas	26
3.2 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS	27
3.3 PLANTAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA	28
3.4 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	30
3.5 GÊNERO MICONIA	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAL BOTÂNICO	38
4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATO ORGÂNICOS DE <i>M. prasina</i>	38
4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	39
4.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE FENÓIS TOTAIS E TANINOS	39
4.5 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS	40
4.6 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CUMARINAS	40
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	41
4.7.1 Método de sequestro de radicais livres (DPPH)	41
4.7.2 Método de sequestro de radicais livre (ABTS⁺)	41
4.7.3 Determinação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio	42
4.7.4 Potencial antioxidante de redução de ferro (FRAP)	42
4.8 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS EM ANIMAIS	43
4.8.1 Animais	43
4.8.2 Solubilização dos extratos	43

4.8.3 Determinação da toxicidade aguda	43
4.8.4 Determinação da atividade anti-inflamatória	44
4.8.4.1 Determinação da migração leucocitária pelo método de bolsão de ar	44
4.8.4.2 Quantificação dos níveis de TNF- α e IL-1 β	44
4.8.4.3 Avaliação do efeito antiedematogênico em modelo de edema de pata induzido por carragenina	44
4.8.4.4 Avaliação do aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético ..	45
4.8.5 Determinação da atividade hepatoprotetora contra intoxicação com acetaminofeno	45
4.8.6 Determinação da toxicidade subcrônica em camundongos	46
4.8.7 Análise estatística	46
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	47
5.1 PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA	47
5.2 DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS, TANINOS, FLAVONOIDES E CUMARINAS	47
5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DPPH, ABTS, COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO E FRAP	48
5.4 TOXICIDADE AGUDA	49
5.5 DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PELO MÉTODO DE BOLSÃO DE AR	50
5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF-A E IL-1B	51
5.7 EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO EM MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA	52
5.8 AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO	54
5.9 ATIVIDADE HEPATOPROTETORA CONTRA INTOXICAÇÃO COM ACETAMINOFENO	55
5.10 EFEITO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA EM CAMUNDONGOS	58
6 CONCLUSÕES	66
REFERÊNCIAS	67
APÊNDICE A - MANUSCRITO 1	86
APÊNDICE B – MANUSCRITO 2	100
APÊNDICE C - MANUSCRITO 3	115

ANEXO A – PARECER FAVORÁVEL DO COMITÊ DE ÉTICA	128
ANEXO B – NORMAS DO PERIÓDICO BRITISH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH	129
ANEXO C – NORMAS DO PERIÓDICO BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE	137
ANEXO D – NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA	142

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma reação fisiológica de tecidos vascularizados em resposta a estímulos nocivos como patógenos, células danificadas ou agentes irritantes. Quando a homeostase do tecido é perturbada, macrófagos e mastócitos liberam mediadores como citocinas, quimiocinas, prostaglandinas, leucotrienos, espécies reativas de oxigênio (EROs) e mediadores bioativos como histamina, que induzem a mobilização e infiltração de leucócitos ao local da lesão (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; FENG; LING; DUAN, 2010).

Uma vez que os agentes nocivos e tecidos danificados são removidos pelos leucócitos, se inicia o reparo tecidual e o retorno à função fisiológica normal. Entretanto, se o agente lesivo não for eliminado, a inflamação se torna crônica, desencadeando a patogênese e progressão de várias doenças inflamatórias (MASKREY et al., 2011).

Apesar do avanço no conhecimento da fisiopatologia da inflamação, os medicamentos atuais ainda apresentam sérios efeitos adversos, como irritação da mucosa gástrica e úlcera, nefrotoxicidade e aumento da incidência de doenças cardiovasculares que comprometem a utilização destes agentes terapêuticos (TESLIM et al., 2014; SLATER et al., 2010; PATRONO; ROCA, 2009). Este fato, estimula a busca por novas moléculas úteis no tratamento da inflamação.

O estudo químico e biológico de plantas constitui uma estratégia eficaz na procura de novos agentes terapêuticos (ATANASOV et al., 2015). A pesquisa de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente, ou serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). Muitas estratégias podem ser consideradas para investigação da atividade farmacológicas de plantas. A abordagem quimiotaxonômica é caracterizada pela seleção de espécies de uma família ou gênero com perfil fitoquímico registrado na literatura (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Neste sentido, o gênero *Miconia* (Melastomataceae) compreende cerca de 1070 espécies que ocorrem desde o sul do México até o Norte da Argentina e Uruguai (GOLDENBERG et al., 2012). Investigações fitoquímicas com espécies de *Miconia* resultaram na identificação ou isolamento de triterpenoides (PEIXOTO et al., 2011; MACARI et al., 1990), flavonóides (RODRIGUES et al., 2011; MANCINI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007), benzoquinonas (GUNATILAKA et al., 2001), cumarinas (CARRAZZONI, 2016), taninos (MOSQUERA et al., 2009; MARTINEZ et al., 2005) e esteróis (MACARI et al., 1990; CREVELIN et al., 2006). Estudos com extratos e compostos isolados de espécies do gênero *Miconia* evidenciaram

importantes atividades biológicas, como antimicrobiana (CELOTTO et al., 2003), antitumoral (CUNHA et al., 2008), tripanocida (CUNHA et al., 2006), antinociceptiva (SPESSOTO et al., 2003; SILVA et al., 2002) e anti-inflamatória (CARRAZZONI, 2016; VASCONCELOS et al., 2006).

Miconia prasina (Sw) DC. - conhecida popularmente como mandapuçá-branco, apaga-brasa e sabiazeira - é uma espécie de hábito arbustivo a arbóreo, cujo fruto tem importância alimentícia para a população da Amazônia brasileira e como fonte de polinização, visto que é o alimento preferido de um grande variedade de dispersores, principalmente aves (CHAGAS, 2012; ANTONINI; NUNES-FREITAS, 2004; PAPAVERO, 2002). Pouco se sabe sobre a composição química e as propriedades farmacológicas desta planta. Tarawneh et al. (2014) demonstraram que três flavanonas isoladas do caule de *M. prasina* exibiram baixa afinidade de ligação ao receptor canabinoide CB2. Os extratos acetato de etila e metanólico das folhas de *M. prasina* apresentaram atividade antimicrobiana e baixa atividade citotóxica em linhagens tumorais e de macrófagos murinos (LEITE, 2016).

Desta forma, a investigação do perfil fitoquímico e dos efeitos farmacológicas e toxicológico dos extratos das folhas *Miconia prasina* contribuirão para a descoberta de novos compostos biologicamente ativos para o desenvolvimento de fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial farmacológico, a toxicidade aguda e subcrônica dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *Miconia prasina* (SW) DC.

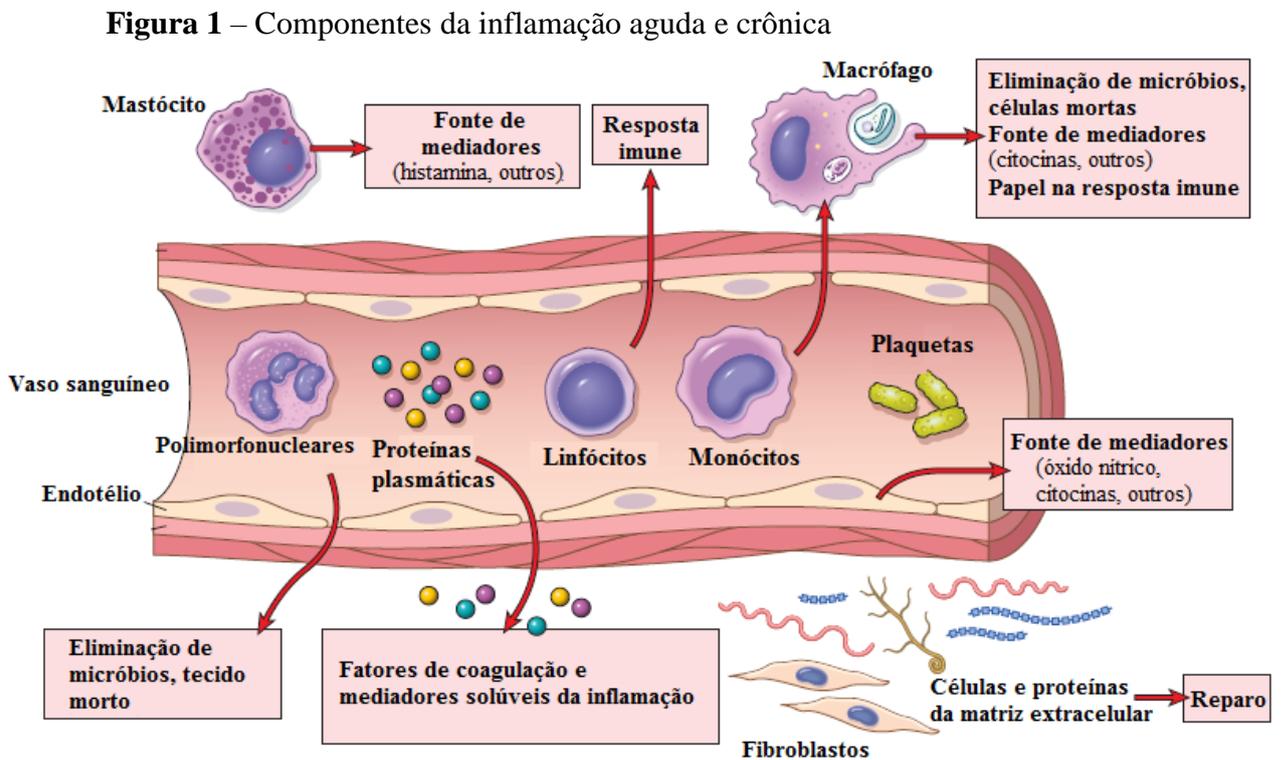
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Obter os extratos orgânicos das folhas de *M. prasina*;
- b) Analisar o perfil fitoquímico dos extratos por CCD;
- c) Quantificar o teor de metabólitos secundários nos extratos;
- d) Investigar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos;
- e) Avaliar a toxicidade aguda dos extratos de *M. prasina*;
- f) Avaliar a atividade anti-inflamatória dos extratos através dos modelos experimentais de inflamação aguda *in vivo* e determinar as concentrações de TNF- α e IL-1 β no exsudato inflamatório de animais tratados com os extratos;
- g) Avaliar o efeito hepatoprotetor do extrato com melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória;
- h) Determinar a toxicidade subcrônica do extrato com melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação da microcirculação desencadeada por agentes nocivos como trauma, infecções, agentes físicos e químicos. Este processo é caracterizado pelo extravasamento de proteínas séricas e leucócitos da circulação sanguínea para o tecido (Figura 1). O extravasamento plasmático é regulado pela liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos, que contribuem para os sinais cardinais da inflamação - calor, vermelhidão, inchaço, dor e perda de função do tecido (VENDRAMINI-COSTA; CARVALHO, 2012; IWALEWA et al., 2007).



Fonte: Adaptado de KUMAR, ABBAS, ASTER, 2013.

O aumento da vasodilatação local e do fluxo sanguíneo para a região inflamada, em conjunto com o aumento da permeabilidade vascular, resultam na perda de fluido e proteínas plasmáticas nos tecidos. Paralelamente, existe uma regulação positiva da expressão de moléculas de adesão sobre as células endoteliais e a liberação de fatores inflamatórios do local inflamado, que facilitam a aderência de células circulantes para o endotélio vascular e sua

migração para a área afetada. Estes eventos resultam na predominância de neutrófilos no local inflamado ao início da lesão, e são gradualmente substituído por células mononucleares (KAPOOR et al., 2012; FRANCISCHETTI et al., 2010; SERHAN; CHIANG; DYKE, 2008). Estas células fagocitam materiais estranhos e débris celulares. Eles também liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas, além de gerar espécies reativas de oxigênio que eliminam os organismos invasores. Finalmente, o estímulo é removido e a estrutura normal do tecido é restaurada. Os mediadores anti-inflamatórios vasculares endógenos alteram e inibe a migração e ativação de leucócitos polimorfonucleares (Figura 1), promovendo a remoção segura de células inflamatórias por apoptose (FULLERTON; GILROY, 2016; LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002). Entretanto, a inflamação pode seguir outro curso que não a resolução, progredindo para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor ou falhas nos processos de resolução, sendo estes fatores importantes na progressão de doenças crônicas de origem inflamatória (MASKREY et al., 2011; MCINNES; SCHETT, 2011; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009; BILATE, 2007).

A inflamação crônica apresenta duração prolongada e está associada a presença de células mononucleares, necrose tecidual, proliferação de fibroblastos e formação de granulomas. As causas da inflamação crônica são, principalmente: infecções persistentes, exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos, auto-imunidade, dentre outras (FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005; GEPIREMEN et al., 2004).

Os monócitos circulantes que são recrutados para a área da inflamação, aderem ao endotélio vascular e migram para o tecido, transformando-se em macrófagos teciduais. A ativação desses macrófagos é mediada por interferon- γ , fator estimulador de macrófagos-granulócitos (GM-CSF), fator de necrose tumoral (TNF- α) e endotoxinas bacterianas. Os macrófagos ativados desempenham um papel de extrema relevância na inflamação crônica, pois além de participar no combate ao agente agressor, eles também regulam respostas de linfócitos a antígenos, secretam mediadores de iniciação e propagação da inflamação, bem como secretam outros mediadores que modulam a proliferação e as atividades de fibroblastos e células endoteliais (reparo tecidual-fibrose) (KOH; DIPIETRO, 2012; CRUVINEL et al., 2010; FUJIWARA; KOBAYASHI, 2005).

3.1.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas como histamina e serotonina são as primeiras substâncias a serem liberadas no desencadeamento da cascata da inflamação. Estas substâncias são estocadas em

vesículas no interior de mastócitos, basófilos e plaquetas, e promovem alterações vasculares que incluem: vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e ativação endotelial. Essas alterações são iniciadas e desenvolvidas durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório (PARADA et al., 2001).

A liberação de histamina pelos mastócitos é desencadeada por diferentes fatores como reações imunológicas envolvendo IgE, fragmentos do complemento C3a e C5a, citocinas (IL-1, IL-18) e fatores liberadores de histamina derivados de leucócitos. A liberação pelas plaquetas é estimulada após contato com colágeno, trombina, difosfato de adenosina, complexos antígeno-anticorpo e fatores de ativação das plaquetas (KOVACOVA-HANUSKOVA et al., 2015; FRANCISCHETTI et al., 2010).

Os efeitos da histamina são mediados pela sua ligação com quatro subtipos de receptores: receptor de histamina H1, H2, H3 e H4. Todos esses receptores pertencem à família dos receptores acoplados à proteína G. O receptor H1 é o responsável por induzir a vasodilatação, aumento da permeabilidade, já o receptor H2 induz o relaxamento do músculo liso, vasodilatação e principalmente o aumento da secreção gástrica. O receptor H3 é responsável pela inibição da síntese e liberação de histamina, enquanto que o receptor H4 promove a quimiotaxia de mastócitos e produção de leucotrienos B4 (CRIADO et al., 2010).

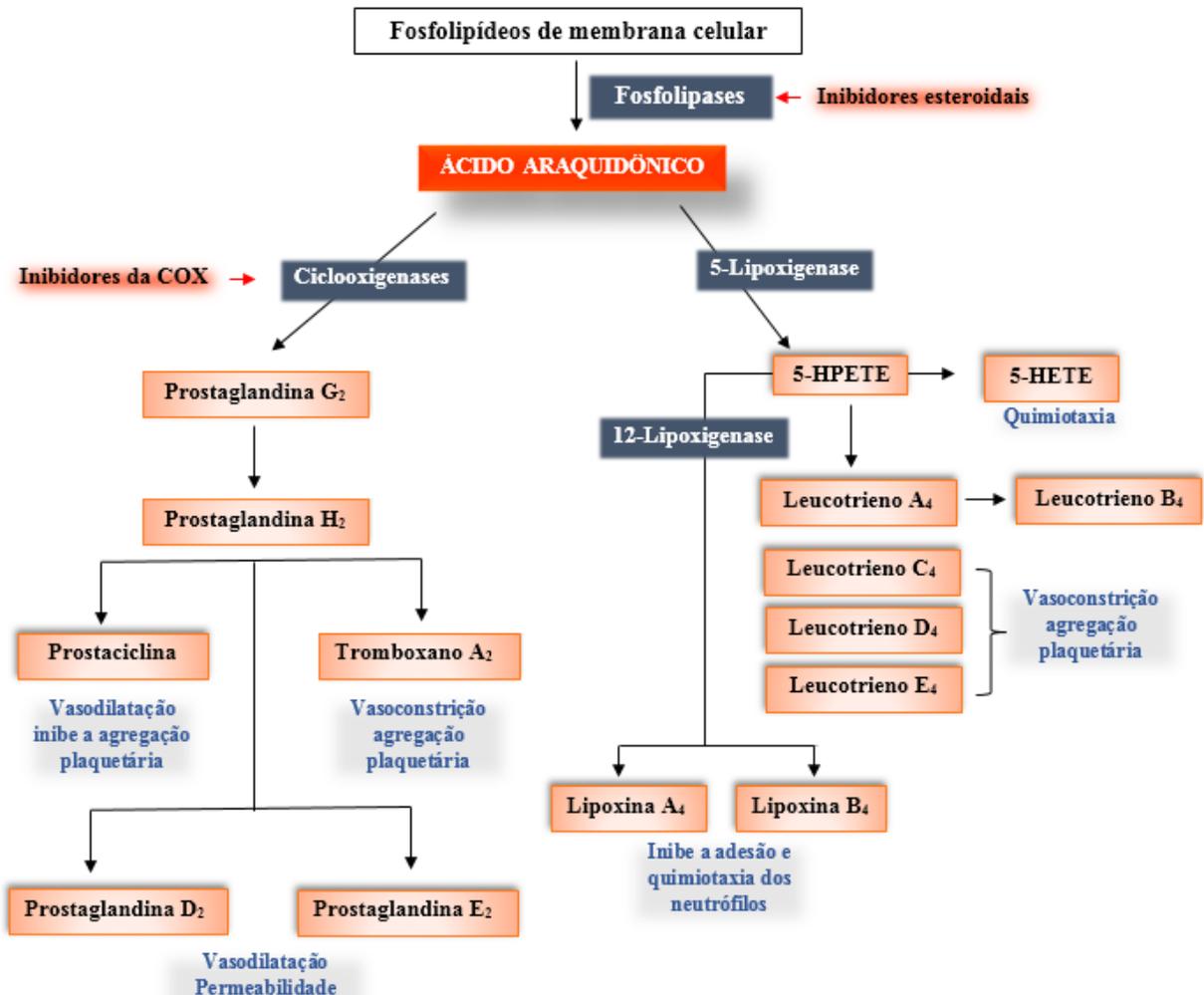
A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina vasoativa oriunda do aminoácido triptofano. Este mediador é encontrado em plaquetas, em algumas regiões do cérebro e em células enterocromafins do intestino (BERGUER; GRAY; ROTH, 2009). A 5-HT tem um papel importante na alteração do tônus e permeabilidade vascular, o que contribui para o extravasamento de fluídos (COLE et al., 1995). A serotonina atua como estimulante das terminações nervosas sensitivas para dor e produz rubor, que são sinais característicos da inflamação (YAMAGUCHI et al., 1999).

3.1.2 Eicosanóides

Os eicosanóides compreendem os prostanóides, leucotrienos e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado presente nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. Ele é liberado principalmente pela ação da enzima fosfolipase A2 que é ativada por diversos estímulos químicos, físicos e mecânicos. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é metabolizado por duas vias enzimáticas, a via da ciclooxigenase (COX) e a via da lipoxigenase (LOX). Pela via da COX é gerada a prostaglandina H2, que estimula a formação de vários prostanóides, incluindo diversas

prostaglandinas e tromboxano A₂. Pela via da lipoxigenase formam-se leucotrienos, lipoxinas e outros produtos (Figura 2) (HWANG et al., 2013; MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009).

Figura 2 – Metabolismo do Ácido Araquidônico na inflamação



Fonte: Adaptado de ROBBINS et al., 2006.

As ciclooxigenases (COX) existem em três isoformas designadas COX-1, COX-2 e COX-3, codificadas por diferentes genes, com estruturas químicas similares. A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva (constante) na maioria dos tecidos. É essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas. Enquanto a COX-2 é induzida nas inflamações por vários estímulos como citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento, originando as prostaglandinas (BATLOUNI, 2010). A COX-3 (variante do gene

da COX-1) parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central e pode ser encontrada também na aorta. Essa enzima é seletivamente inibida por drogas analgésicas e antipiréticas, como paracetamol e dipirona, e é potencialmente inibida por alguns AINEs (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). As prostaglandinas em geral são vasodilatadoras, promovendo o edema, rubor, febre, infiltração de leucócitos e ainda sensibilizam as terminações nervosas periféricas, tornando-as mais responsivas a estímulos algícos. As prostaglandinas E2 e I2 são potentes vasodilatadores, que potencializam o aumento da permeabilidade vascular. Ambas causam dor indiretamente devido a formação do edema que comprime as fibras nervosas. Além disso, amplificam os efeitos da bradicinina e histamina através da diminuição do limiar de excitabilidade de nociceptores vinculados as fibras nervosas (GOMES et. al., 2009).

A prostaglandina I2 inibe a agregação plaquetária e a prostaglandina E2 está relacionada ao desenvolvimento da febre. A prostaglandina D2 participa das respostas alérgicas, causa vasodilatação e potencializa a formação de edema. O tromboxano A2 é um ativador da agregação plaquetária e potente vasoconstritor (SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011).

Os leucotrienos são fatores quimiotáticos e ativadores de leucócitos. Estes compostos são sintetizados principalmente nos leucócitos, entretanto, após um estímulo inflamatório, podem ser produzidos por qualquer célula que possua um sistema enzimático adequado a sua síntese (HAEGGSTROM; FUNK, 2011; YOKOMIZO, IZUMI, SHIMIZU, 2001). Além das ações quimiotáticas, os leucotrienos também são potentes agentes vasoativos e espasmogênicos, participam da formação do edema, induzem a liberação de tromboxano A2 e prostaglandinas, além de representarem um componente especialmente importante em diversas fisiopatologias, como, asma, artrite reumatóide e respostas alérgicas (HORN et al., 2015).

3.1.3 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um gás solúvel liberado a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Três isoformas desta enzima são conhecidas: NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS) são constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e sua ativação é dependente de cálcio. Em contraste com as isoformas constitutivas da NOS, a iNOS não requer um aumento de cálcio para iniciar a sua atividade. Em macrófagos, monócitos e outras células, a indução de iNOS e a presença de L-arginina são suficientes para iniciar a geração de NO. A indução da iNOS pode

ser iniciada por lipopolissacarídeo e citocinas inflamatórias como IFN- γ , TNF- α ou IL-1 (LANAS, 2008; MARIOTTO et al., 2007)

Baixas concentrações de NO produzido por NOS constitutivas inibem a expressão de moléculas de adesão, síntese de citocinas e quimiocinas, e conseqüentemente a adesão e transmigração de leucócitos (GUZIK; KORBUT; ADAMEK-GUZIK, 2003).

Durante o curso de uma resposta inflamatória, grandes quantidades de NO formadas por iNOS ultrapassam as quantidades fisiológicas. A iNOS catalisa a formação de espécies reativas de nitrogênio no local do estímulo inflamatório, além de promover a ativação do fator de transcrição nuclear- κ B (NF- κ B), um dos principais fatores responsáveis por regular a expressão de vários mediadores pro-inflamatórios (KELLEHER et al., 2007; OKAMOTO et al., 2004).

O NO apresenta importantes ações durante o processo inflamatório, como do relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres que são protetores contra agentes infecciosos e células tumorais mas que também podem ser lesivos para o próprio organismo, contribuindo para o estabelecimento de doenças inflamatórias (TSUCHIYA et al., 2007, RIBBONS et al., 1997).

3.1.4 Citocinas

As citocinas são importantes mediadores do processo inflamatório produzidos por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e linfócitos ativados. As citocinas são pleiotrópicas e modulam a função de muitos tipos celulares. O conjunto inicial de reações que caracteriza a fase aguda do processo inflamatório é mediado primariamente pela liberação de citocinas pro-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) no tecido lesado (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000).

A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas e lesões físicas. Essas citocinas, uma vez liberadas, exercem efeitos autócrinos (atuam na mesma célula que secretou a citocina), parácrinos (afetando células vizinhas) e endócrinos (promovendo efeitos sistêmicos, assim como os hormônios) (BILATE, 2007).

As citocinas TNF e a IL-1 β iniciam a cascata inflamatória ativando as células endoteliais, que aumenta a expressão e síntese de moléculas de adesão endotelial, aumentando a aderência dos leucócitos circulantes as células endoteliais, e também a síntese e liberação de outras citocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico (SIMS, SMITH, 2010; DINARELLO, 2009; POBER, SESSA, 2007).

Algumas citocinas desempenham papéis importantes no estabelecimento e no desenvolvimento do processo inflamatório atuando como substâncias pró-inflamatórias que induzem a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios típicos como as prostaglandinas, os leucotrienos e o óxido nítrico (FRANKE et al, 2002). Enquanto outras citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 atuam como agentes anti-inflamatórios, diminuem as funções celulares e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a dor e a quimiotaxia de leucócitos (VALE et al., 2003).

3.2 FÁRMACOS ANTI-INFLAMATÓRIOS

Os glicocorticóides (anti-inflamatórios esteróidais) são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios, hematológicos, alérgicos, entre outros. Os glicocorticóides são substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias potentes, eficazes e amplamente utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos (PERRETTI, AHLUWALIA, 2000).

Os glicocorticóides sintéticos (dexametasona, cortisona, etc) mimetizam ações do cortisol endógeno, atuando através da ligação a um receptor citoplasmático específico para glicocorticóides. Exercem sua ação analgésica e anti-inflamatória impedindo a liberação de ácido araquidônico da membrana das células lesadas (pela inibição das fosfolipases), diminuindo também a transcrição de alguns genes responsáveis pela expressão de algumas citocinas, ou ainda pela inibição de funções específicas de linfócitos e alterações em grau de fibrose (ANTI, GIORGI, CHAHADE, 2008; CASTRO, 2005).

A eficácia dos glicocorticóides em aliviar desordens inflamatórias resulta dos efeitos pleiotrópicos do receptor de glicocorticóide. No entanto, uso prolongado de glicocorticóides promovem diversos efeitos adversos como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, inibição da cicatrização, osteoporose e distúrbios metabólicos (RHEN, CIDLOWSKI, 2005).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. São classe heterogênea de fármacos utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios músculo esquelético (ZHOU; BOUDREAU; FREEDMAN, 2014).

Os AINEs apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas (PEREIRA-LEITE et al., 2016). Os efeitos terapêuticos dos AINEs resultam principalmente da inibição da enzima COX, reduzindo assim, a síntese das prostaglandinas e diminuindo a

intensidade do processo inflamatório. Os efeitos colaterais associados aos AINEs incluem os problemas gastrintestinais, pois as prostaglandinas exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica; alteração na função renal em pessoas com predisposição, alteração no tempo de coagulação e hipersensibilidade (PATRIGNANI; PATRONO, 2015; CONAGHAN, 2012; SOSTRES et al, 2010).

Os AINEs seletivos para a COX-2 são designados COXIBEs e foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese de prostaglandinas pela enzima COX-2 em locais de inflamação sem, contudo, afetar a ação da isoenzima COX-1 constitutivamente ativa, encontrada no trato gastrointestinal, nos rins e plaquetas. No entanto, hoje se sabe que a COX-2 também é expressa constitutivamente e exerce papéis fisiológicos através da síntese de prostaglandina I₂ (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Embora os fármacos que inibem seletivamente a COX-2 demonstrem uma melhor segurança gastrintestinal, alguns membros dessa classe foram retirados do mercado devido a um risco aumentado de eventos cardiovasculares (BATLOUNI, 2010). Entretanto o aumento do risco de insuficiência cardíaca não se restringem aos COXIBEs, mas se aplica a AINEs tradicionais (ARFÉ et al., 2016).

3.3 PLANTAS E METABÓLITOS SECUNDÁRIOS COM ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Produtos naturais desempenham um papel importante na saúde humana, em relação à prevenção e tratamento de diversas doenças. Apesar dos avanços no desenvolvimento de métodos para a síntese química de produtos farmacêuticos, as plantas ainda representam importantes fontes de novas moléculas com interesse farmacológico (MUNARI et al., 2010; VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006).

Metabólitos secundários são compostos orgânicos produzidos por todas as plantas a partir de substâncias formadas no metabolismo primário. A produção desses componentes tem como função proteger a planta contra patógenos, ataque de herbívoros, bem como beneficiá-la na competição com outros vegetais. Além disso, favorecem a atração de animais dispersores de sementes e de polinizadores. Acrescidos a estes fatores bióticos, a produção de metabólitos secundários também protege o vegetal de influências externas, como temperatura, umidade, proteção contra raios UV e deficiência de nutrientes minerais (SIMÕES et al., 2010).

O estudos dos metabólitos secundários despertam o interesse de pesquisadores de vários campos da ciência, principalmente na pesquisa de fármacos, devido a variedade de compostos

e atividades biológicas exercidas por eles. Assim se faz necessário descrever e compreender a diversidade dos metabólitos secundários, seus modos de ação isolados ou em combinações naturais como encontrado nas plantas (WINK, 2015).

A preparação de extratos é o primeiro passo no sentido de testar uma atividade farmacológica de plantas, pois diferentes compostos ativos em um extrato podem atuar sinergicamente (UMAR et al., 2014). Entretanto, o uso de extratos possui algumas desvantagens em comparação aos compostos isolados. A mistura de diferentes compostos pode também conduzir a efeitos inibitórios, ou seja, um componente pode reduzir a atividade biológica do outro (HAMMER et al. 2007).

Entre as diferentes atividades biológicas de produtos vegetais estudadas, o efeito anti-inflamatório é um dos mais relatados. Numerosos produtos vegetais demonstraram exercer um potente efeito anti-inflamatório *in vitro* e *in vivo* através de mecanismos moleculares distintos. Entre os principais mecanismos está a inibição das enzimas ciclooxigenases (COX), lipoxigenases (LOX) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), e a inibição dos fatores de transcrição NF- κ B e STAT (AZAB; NASSAR; AZAB, 2016).

O ácido acetilsalicílico (aspirina), embora seja uma substância sintética, obteve sua síntese com base na estrutura química do ácido salicílico, um salicilato isolado da *Salix alba* (GERTSCH et al., 2011). Os efeitos anti-inflamatórios da aspirina são em parte pela inibição do metabolismo do ácido araquidônico através acetilação irreversível da enzima ciclooxigenase, impedido assim a produção de tromboxano e prostaglandinas (CLELAND, 2002).

Muitos estudos têm apresentado o ácido ursólico como um dos principais compostos responsáveis pelas atividades anti-inflamatórias de várias plantas. Este triterpeno pentacíclico apresenta atividade anti-inflamatória através de diversos mecanismos, incluindo a inibição da produção de IL-2, IFN- γ , TNF- α (AHMAD et al., 2006) e prostaglandina E₂ (KANG et al., 2008). Outros estudos demonstraram que as propriedades anti-inflamatórias do ácido ursólico são mediadas pela supressão do NF- κ B, um importante fator de transcrição que regula a expressão de múltiplas citocinas pró-inflamatórias (CHECKER et al., 2012; LU et al., 2011; WANG et al., 2011).

Os metabólitos secundários isolados de plantas também podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes e menos tóxicos, ou utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (LIU, 2005; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1996). O ácido 2-ciano-3,12-dioxooleana-1,9 (11) - dieno-28-óico (CDDO), um derivado semissintético do ácido oleanólico, demonstrou atividade

anti-inflamatória mais potente do que o seu precursor, sendo mais eficaz na inibição das enzimas iNOS e COX₂ (SUH et al., 1998).

Os avanços da pesquisa de compostos bioativos obtido de plantas, conduziram à identificação e a caracterização de uma variedade das substâncias com promissora atividade anti-inflamatória (MAIONE et al., 2016). Entretanto ainda são necessários a investigação de diversas etapas como elucidação do mecanismo de ação e eficácia e segurança em estudos clínicos (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

3.4 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

O uso de plantas medicinais para tratamento, cura e prevenção de determinadas doenças é uma prática medicinal antiga da humanidade e está apoiada e está em um conhecimento consolidado por séculos de observação, no entanto plantas medicinais não são sinônimo de inocuidade (VEIGA JUNIOR et al., 2005; NICOLETTI et al., 2007).

Os produtos naturais são agentes xenobióticos, que ao ser introduzido no organismo humano sofre biotransformação e pode, desta forma, gerar produtos tóxicos. A utilização crônica de plantas pode acarretar maiores riscos. Visto que, em alguns casos os efeitos colaterais podem não se manifestar de forma imediata, o que intensifica as ações tóxicas, como por exemplo, comprometimento hepático e renal, alterações hematológicas, problemas cardiovasculares, efeitos carcinogênicos e complicações neurológicas (TÔRRES et al., 2005; BERRIN et al., 2006; SILVEIRA et al., 2008).

Exemplos da toxicidade de plantas medicinais podem ser encontrados na literatura, como é o caso do *Symphytum officinale* L (Confrei), que foi indicado para o tratamento de diversas doenças. Porém estudos posteriores demonstraram o risco do uso sistêmico, pois é altamente hepatotóxica devido aos alcaloides pirrolizidínicos (BRASIL, 1992; STICKEL, SEITZ, 2000).

Outro exemplo é a *Piper methysticum* (kava-kava), utilizada para o tratamento da ansiedade, insônia e depressão. O uso oral desta planta medicinal por um curto período de tempo é considerado seguro, contudo pode apresentar toxicidade quando administrada em altas doses ou a longo prazo. A kava-kava pode exacerbar quadros de insuficiência hepática, bem como hepatite em pacientes com histórico recorrente desta doença, sendo este efeito reversível após a suspensão do fitoterápico (CORDEIRO, CHUNG, SACRAMENTO, 2005).

O uso abusivo de plantas amplamente conhecidas na medicina também podem acarretar em efeitos tóxicos, como é o caso da *Panax ginseng* C.A. Meyer, uma espécie utilizada na

medicina tradicional chinesa que se propagou pelo mundo. Sua ingestão crônica e abusiva causa hipertensão, nervosismo, insônia e diarreia (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O Brasil possui uma grande variedade de plantas, infelizmente, a maior parte das plantas medicinais que são utilizados pela população não tem sua eficácia e efeitos tóxicos avaliados (VEIGA-JUNIOR, 2008). O uso das plantas através da medicina popular não é suficiente para que ocorra a validação destas como seguras, neste sentido, os estudos farmacodinâmicos e toxicológicos são necessários para que ocorra a identificação entre dose/ risco e benefício do seu uso (ALMEIDA et al., 2009).

3.5 GÊNERO MICONIA

O gênero *Miconia* é encontrado nas Américas, ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina e Uruguai (GOLDENBERG, 2000). Estudos etnobotânicos relataram variados usos populares das espécies deste gênero como eupéptica, antirreumático (CRUZ; KAPLAN, 2004; STALCUP, 2000), para tratar resfriado e febre (BOSCOLO, 2008), ações antisséptica, cicatrizante (FENNER et al., 2006) e para afecções da garganta (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). Além do uso medicinal, espécies deste gênero foram descritas com uso alimentício, ornamental e religioso (AQUINO et al., 2007; MAIOLI-AZEVEDO; FONSECA-KRUEL, 2007; RONDON NETO et al., 2010).

Devido a sua ampla distribuição e biodiversidade no território brasileiro, o gênero *Miconia* tem proporcionado a realização de vários estudos farmacológicos e químicos (Tabela 1). Vasconcelos et al. (2003) demonstraram os efeitos analgésicos dos extratos brutos (hexano e diclorometano) obtidos de *M. albicans*. Posteriormente, triterpenos (ácidos ursólico e oleanólico) isolados a partir do extrato bruto de diclorometano de *M. albicans* apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica (VASCONCELOS et al., 2006). Os extratos de *M. ligustroides* (hexano, diclorometano e etanol), *M. rubiginosa* (hexano, diclorometano e etanol) e *M. fallax* (etanol) também demonstraram efeito analgésico (CUNHA et al., 2003a, SPESSOTO et al., 2003; SILVA et al., 2002).

Estudos científicos comprovaram a atividade antimicrobiana dos extratos de *M. albicans*, *M. rubiginosa*, *M. cabucu* (RODRIGUES et al., 2008; CELOTTO et al., 2003) e *M. ligustroides* (CUNHA et al., 2010). Outros estudos revelaram que compostos fenólicos de *Miconia myriantha* Benth. mostraram efeitos inibitórios contra proteases aspárticas secretadas por *Candida albicans* (PIERONI et al., 2011).

Tabela 1 – Atividades biológicas e composição química do gênero *Miconia*.

Espécie	Parte da planta	Atividade biológica	Composição química	Referência
<i>Miconia aeruginosa</i>	Folhas	Antioxidante	Taninos e flavonoides	MOSQUERA et al., 2009
<i>Miconia albicans</i> (Sw.) Triana	Folhas	Antioxidante	Quercetina, quercetina glicosilada, rutina e ácido ursólico.	PIERONI et al., 2011
	Folhas	Citotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2011
	Folhas	Genotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2008
	Folhas	-	β -amirina, α -amirina, lupeol, estigmasterol e β -sitosterol	CREVELIN et al., 2006
	Folhas	Antinociceptivo	Ácido ursólico e ácido oleanólico	VASCONCELOS et al., 2006
	Folhas	Antimicrobiano	-	CELOTTO et al., 2003
	Madeira	-	Ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido arjunólico e sitosterol	MACARI et al., 1990
<i>Miconia alypifolia</i>	Folhas	Antioxidante	Apigenina, kaempferol e quercetina em suas formas glicosídicas	MANCINI et al., 2008
<i>Miconia cabucu</i>	Folhas	Citotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2011
	Folhas	Genotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2008

Tabela 1 – Atividades biológicas e composição química do gênero *Miconia* (Continuação).

Espécie	Parte da planta	Atividade biológica	Composição química	Referência
<i>Miconia cabucu</i>	Folhas	Antioxidante	Quercetina e suas formas glicosídicas, rutina, α -amirina, ácido betulínico e ácido ursólico	PIERONI et al., 2011
	Folhas	-	Quercetina, miricetina e kaempferol glicosídico, ácido gálico e biflavonoide	RODRIGUES et al., 2007
<i>Miconia ciliata</i>	Folhas	Ativador do receptor NMDA	-	HASRAT et al., 1997
<i>Miconia coronata</i> (BONPL.) DC	Folhas	Bactericida	Ácido elágico, kaemferol glicosídico e isoflavona diglicosilada,	MARTINEZ et al., 2007
	Folhas	-	β -Sitosterol e taninos condensados	MARTINEZ et al., 2005
<i>Miconia fallax</i> DC	Folhas	Antitumoral	Ácido ursólico e ácido oleanólico	CUNHA et al., 2008
	Folhas	-	β -amirina, α -amirina, lupeol, estigmasterol e β -sitosterol	CREVELIN et al., 2006
	Folhas	Tripanocida	Ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido gipsogênico	CUNHA et al., 2003b
<i>Miconia ioneura</i>	Folhas	-	Sideroxilina	PAGOLA et al., 2008
<i>Miconia langsdorffii</i>	Folhas	Leishmanicida	Ácido ursólico e ácido oleanólico	PEIXOTO et al., 2011

Tabela 1 – Atividades biológicas e composição química do gênero *Miconia* (Continuação).

Espécie	Parte da planta	Atividade farmacológica	Composto isolado	Referência
<i>Miconia lepidota</i>	Folhas	Anticancerígeno	Benzoquinonas	GUNATILAKA et al., 2001
<i>Miconia ligustroides</i>	Folhas	-	Ácido ursólico e ácido oleanólico	CUNHA et al., 2010
	Folhas	-	Ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido urjinólico	CUNHA et al., 2006
	Folhas	-	β -amirina, β -sitosterol, α -amirina e estigmasterol	CREVELIN et al., 2006
<i>Miconia myriantha</i>	Folhas	Inibidor da protease aspática secretada por <i>Candida albicans</i>	Matucinol glucopiranosídeo, ácido elágico, e ácido gálico	LI et al., 2001
<i>Miconia perpericarpa</i>	Folhas	-	β -amirina, α -amirina, lupeol, estigmasterol e β -sitosterol	CREVELIN et al., 2006
<i>Miconia prasina</i> (Sw) DC	Caule	-	Miconiosídeo C, 7-O- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosil mateucinol, miconiosídeo B, mateucinol, farrerol e demetoximateucinol	TARAWNEH et al., 2014
<i>Miconia rubiginosa</i>	Folhas	-	Quercetina glicosilada, kaempferol glicosilados, ácido gálico, epicatequina e casuarictina	RODRIGUES et al., 2011
	Folhas	Antimicrobiano	-	CELOTTO et al., 2003

Tabela 1 – Atividades biológicas e composição química do gênero *Miconia* (Continuação).

Espécie	Parte da planta	Atividade farmacológica	Composto isolado	Referência
<i>Miconia rubiginosa</i>	Folhas	-	Epicatequina, quercitina glicosilada e ácido gálico	RODRIGUES et al., 2008
	Folhas	Genotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2008
	Folhas	-	β -amirina, β -sitosterol, α -amirina e lupeol	CREVELIN et al., 2006
	Folhas	Analgésico	Ácido ursólico, ácido oleanólico, lupeol e β -sitosterol	SPESSOTO et al., 2003
<i>Miconia sellowiana</i>	Folhas	-	Ácido ursólico e ácido máslico	CUNHA et al., 2006
	Folhas	-	β -amirina, β -sitosterol, α -amirina, lupeol e estigmasterol	CREVELIN et al., 2006
<i>Miconia stenostachya</i>	Folhas	Citotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2011
	Folhas	Genotóxico e antimutagênico	-	SERPELONI et al., 2008
	Folhas	Tripanocida	Ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido gipsogênico	CUNHA et al., 2003 b
<i>Miconia trailli</i>	Folhas	-	Mateucinol e flavanonas glicosiladas	ZHANG et al., 2003
<i>Miconia spp.</i>	Folhas	-	Primina, quinol e miconidina	BERNAYS et al., 1984

Fonte: Elaborada pelo autor.

Triterpenos isolados de *M. fallax* DC., *M. stenostachya* DC., *M. sellowiana* e *M. ligustroides* foram ativos contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CUNHA et al., 2003b; CUNHA et al., 2006). O estudo bioguiado do extrato hidroalcoólico de *M. langsdorffii* demonstrou que sua atividade leishmanicida se devia aos compostos majoritários, ácidos ursólico e oleanólico (PEIXOTO et al., 2011).

Com base no potencial químico e farmacológico do gênero *Miconia* descrito na literatura, nosso grupo de pesquisa avaliou a atividade farmacológica de extratos orgânicos das folhas de espécies do gênero *Miconia*. Resultados preliminares demonstraram que os extratos de *Miconia prasina* apresentaram baixa citotoxicidade e o extrato acetato de etila na concentração de 60 µg/mL mostrou-se ativo contra *M. luteus* (LEITE, 2016).

M. prasina é um planta de porte arbustivo a pequena árvore (Figura 3), folhas cartáceas e flores pequenas em panículas. É popularmente conhecida como mandapuça-branco, apaga-brasa e sabiazeira. *M. prasina* é nativa das Antilhas, México e América do Sul (PEIXOTO; ROSA; SILVA, 2002). No Brasil está presente na caatinga, cerrado e mata atlântica (REZENDE; ROMERO; GOLDENBERG, 2014) e distribuído por todos estados do país (REFLORA, 2017).

Figura 3 - *Miconia prasina* (Sw.) DC.



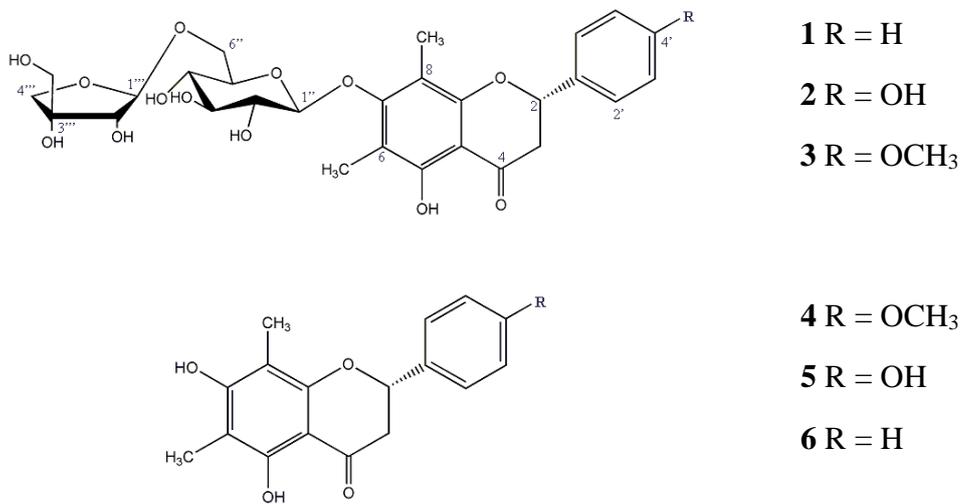
Fonte: Centro de Pesquisas Ambientais do Nordeste - CEPAN

Tarawneh et al. (2014) isolaram seis flavanonas do caule de *M. prasina* (Figura 4), onde três desses compostos exibiram baixa afinidade de ligação ao receptor canabinoide CB2. O receptor CB2

é um dos componentes do sistema canabinóide endógeno que está envolvido principalmente em ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. A ativação seletiva do receptor CB2 tem o potencial de fornecer os efeitos anti-inflamatórios dos canabinóides sem os efeitos psicoativos (ASTHON; GLASS, 2007).

Poucos estudos químico e farmacológicos foram realizados com a espécie *Miconia prasina*, este fato reforça a relevância desta tese. Desta forma a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *Miconia prasina*, contribuirão para a descoberta de novos compostos para o desenvolvimento de fármacos.

Figura 4 – Substâncias isoladas de *Miconia prasina* (Sw) DC.



Fonte: Tarawneh et al., 2014.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

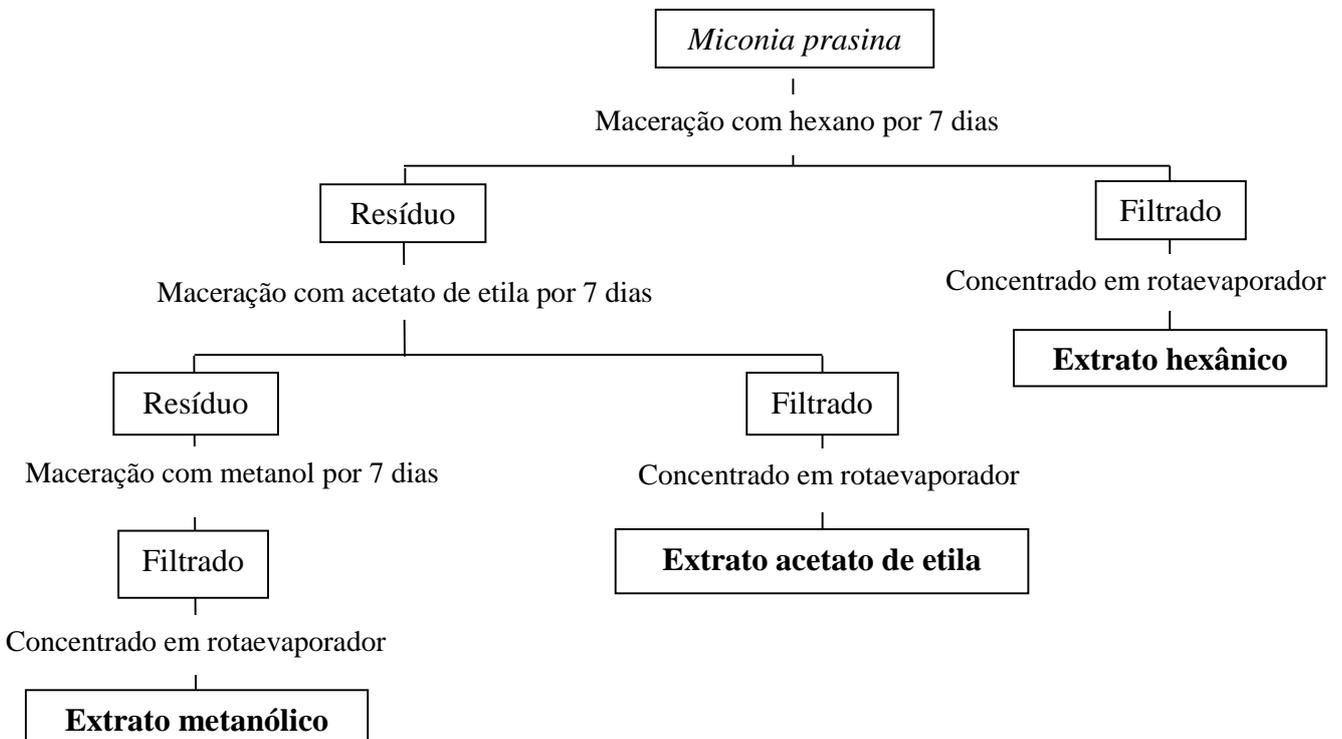
4.1 MATERIAL BOTÂNICO

As folhas de *Miconia prasina* (Sw.) DC. foram coletadas no período de março de 2013 em Rio Largo, Alagoas, Brasil. A planta foi identificada pelo botânico Earl Celestino de Oliveira Chagas do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL) e uma exsiccata foi depositada no herbário do IMA-AL (Nº 50398).

4.2 OBTENÇÃO DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DE *M. prasina*

As partes aéreas da espécie coletada foram secas por 4 dias, em estufa com temperatura controlada e renovação constante de ar. A mesma foi moída em moinho de facas e extraída por maceração à temperatura ambiente com hexano por sete dias (Figura 5). O extrato foi filtrado e o resíduo foi submetido a extração com acetato de etila durante sete dias. Novamente, o extrato foi filtrado e o resíduo foi macerado com metanol pelo período de sete dias. Os filtrados foram rotaevaporados sob pressão reduzida para se obter o extrato de hexânico (EHMP, 2 g), extrato de acetato de etila (EAMP, 3 g) e extrato metanólico (EMMP, 10 g).

Figura 5 – Fluxograma do método de extração



Fonte: Elaborada pelo autor.

4.3 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

Para análise, 5 mg dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram dissolvidos em 1 mL de seus respectivos solventes para se obter a concentração final de 5 mg/mL. Como fase fixa foram utilizadas placas de sílica gel F₂₅₄ e como fases móveis foram utilizados os sistemas eluentes para cada classe de metabólitos. Os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e pulverizadas com reveladores específicos para visualizar os compostos (Tabela 2).

Tabela 2 – Sistemas de eluição e reveladores utilizados para caracterização de metabólitos secundários por cromatografia em camada delgada.

Classe química	Padrão	Sistema eluente	Revelador	Referências
Alcalóides	Escopolamina	Tolueno: acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Dragendorff	WAGNER; BLADT, 2001
Cumarinas	Ácido cumárico	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	KOH etanólico 10%	WAGNER; BLADT, 2001
Derivados antracênicos	Antraquinona	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	KOH etanólico 10%	WAGNER; BLADT, 2001
Flavonóides e taninos hidrolisáveis	Ácido gálico Ácido tânico Rutina quercetina	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:26)	NEU	WAGNER; BLADT, 2001
Mono, sesqui e diterpenos	Carvacrol	Tolueno: acetato de etila (93:7)	Vanilina sulfúrica	WAGNER; BLADT, 2001
Triterpenóides e esteroides	Lupeol Sitosterol	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	Lieberman-Burchard	HARBORNE, 1982

Fonte: LIMA-SARAIVA, 2012 com modificações. NEU: Difenilborinato de amino-2etila.

4.4 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR FENÓIS TOTAIS E TANINOS

A quantificação dos fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, o qual envolve a redução do reagente por compostos fenólicos da amostra com a formação de um complexo azul no qual a sua intensidade aumenta linearmente (AMORIM et al., 2008). As soluções estoque dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. Posteriormente,

adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, 1 mL da solução de carbonato de sódio e completou o volume para 10 mL com água destilada. As amostras permaneceram por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm. Foram avaliadas seis repetições de cada extrato. A equação de calibração do ácido tânico foi $y = 0,0839x + 0,0134$ ($R^2 = 0,9902$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama do extrato (mg EAT/g). Para quantificar os fenóis residuais, 1 g de caseína foi adicionado em 12 mL de água destilada e adicionado 6 mL dos extratos na concentração de 1 mg/mL. Após três horas de reação sob agitação, a solução foi filtrada e adicionado 7 mL de água destilada. Uma alíquota de 1 mL da solução foi retirada e quantificada pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos é calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais.

4.5 QUANTIFICAÇÃO DE FLAVONOIDES TOTAIS

A quantificação de flavonoides foi obtida pelo método descrito por Peixoto Sobrinho et al. (2008), com modificações. As soluções estoque dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. Um volume de 0,2 mL dos extratos foram transferidas, em triplicata, para tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio foram acrescentados 0,12 mL de ácido acético glacial, 2 mL da solução metanólica de piridina a 20%, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio em metanol a 5%, completando-se o volume até 10 mL com água destilada. Após 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm em cubetas de quartzo. De forma semelhante ao procedimento foi construído uma curva com o padrão rutina. A equação de calibração de rutina foi $y = 0,0299x + 0,0015$ ($R^2 = 0,9991$). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de rutina por grama do extrato (mg ER/g).

4.6 QUANTIFICAÇÃO DO TEOR DE CUMARINAS

Para determinar o teor de cumarinas foi utilizado o método descrito por Osório e Martins (2004), com modificações. Os extratos EHMP, EAMP e EMMP foram diluídos em metanol na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 0,5 mL dos extratos foram transferidos em triplicata para tubos de ensaio, adicionado 2 mL de água destilada e 500 µL de uma solução de acetato de chumbo a 5%. As amostras foram agitadas, e em seguida foi adicionado 7 mL de água destilada. Posteriormente, foi transferido 2 mL desta solução para novos tubos de ensaio, adicionado 8 mL de solução de ácido clorídrico a 0,1 M e mantidos em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 320 nm. De forma semelhante ao procedimento foi construído uma curva com o padrão cumarina (Sigma-Aldrich). A equação de

calibração de cumarina foi $y = 0,0215x + 0,0085$ ($R^2 = 0,9937$). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de cumarina por cada grama do extrato (mg EC/g).

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

A avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH• foi determinada através da metodologia descrita por Brand-Williams (1995), com modificações. As soluções estoques dos extratos foram preparadas nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg/mL. Os extratos foram diluídos em etanol nas concentrações de 5 a 500 µg/mL, e alíquotas de 30 µL dessas soluções foram distribuídas em triplicata numa placa de 96 poços. Em seguida, 270 µL da solução de DPPH• (23,6 µg/mL em etanol) foi adicionado aos poços e incubado por 30 minutos protegido da luz. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A absorbância foi lida em espectrofotômetro de placa a 517 nm. A atividade sequestradora foi expressa como concentração efetiva para obter 50% de atividade antioxidante (CE_{50}) utilizando a análise de regressão linear, obtida pelo programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

4.7.2 Método de sequestro de radicais livre 2,2-azobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS⁺)

Para realização deste ensaio, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. (1999). O radical ABTS⁺ (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi formado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas (tempo necessário para a formação do radical). Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorbância de 0,70 ($\pm 0,05$) a 734 nm. Foram misturados 30 µL de extratos de plantas (1 mg/mL) com 3 mL da solução de trabalho e deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorvância a 734 nm. O Trolox foi utilizado como controle positivo e a solução de trabalho como controle negativo. A atividade sequestradora do radical ABTS foi expressa em percentagem de inibição de ABTS⁺ de acordo com a equação:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$$

4.7.3 Determinação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio

Para a avaliação da atividade antioxidante total empregou-se o método do complexo fosfomolibdênio, formado pela reação da solução de fosfato sódico monobásico (28 mL, 0,1 mol/L), solução de molibdato de amônio (12 mL, 0,3 mol/L) e solução de ácido sulfúrico (20 mL, 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL. Os extratos foram diluídos a concentração de 1 mg/mL e alíquotas de 0,3 mL foram adicionadas em tubos de ensaio com 3,0 mL do reagente fosfomolibdênio. Os tubos foram tampados e levados ao banho de água a 95 °C por 90 minutos. Após resfriamento procedeu-se a leitura da absorbância a 695 nm em espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata, como branco foi utilizado 1 mL do reagente mais 0,1 mL de metanol (PRIETO et al., 1999). A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras foi expressa em relação ao ácido ascórbico, considerando sua absorbância correspondente a 100% de atividade antioxidante.

$$\text{CAT (\%)} = [(\text{Absorbância amostra} - \text{absorbância branco}) / (\text{absorbância ácido ascórbico} - \text{absorbância branco})] \times 100$$

4.7.4 Potencial antioxidante de redução de ferro (FRAP)

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) foi utilizado o procedimento descrito por Benzie e Strain (1996). Este ensaio se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltiazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. No ensaio FRAP, soluções de tampão acetato, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) e TPTZ (10 mM) foram adicionadas na proporção 10:1:1, originando o reagente FRAP. As amostras dos extratos de *M. prasina* foram diluídas em metanol (1mg/mL). Em seguida, alíquotas (0,2 mL) de cada extrato foram misturadas com 1,8 mL do reagente FRAP e após incubação em banho-maria a 37 °C durante 30 min a absorbância da reação foi medida a 593 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO_4 /g de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com o padrão FeSO_4 , em diferentes concentrações (125 a 1 000 $\mu\text{g/mL}$). O Trolox foi utilizado como controle positivo.

4.8 ENSAIOS FARMACOLÓGICOS EM ANIMAIS

4.8.1 Animais

Foram utilizados camundongos albinos swiss machos e fêmeas *Mus musculus* (25-30 g) e *Rattus norvegicus* machos (190-200 g) provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 ± 2 °C e umidade do ar de 50-60 %, com ciclo claro / escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados no ambiente do laboratório no mínimo 24 horas antes do experimento. Os animais foram mantidos em jejum 8 horas antes do início de cada experimento. Os procedimentos foram aprovado pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (N° 23076.030375/2014-20).

4.8.2 Solubilização dos extratos

Para os experimentos *in vivo*, os extratos EHMP e EAMP foram diluídos em salina com 5 % de tween 80 (veículo) e o extrato EMMP foi diluído em solução salina (0,9 % NaCl).

4.8.3 Determinação da toxicidade aguda

Este experimento foi realizado segundo a metodologia proposta pelo Guia 423 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001). Este protocolo estabelece doses fixas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg, iniciado com a dose mais propensa a causar mortalidade. Ocorrendo a morte de 0-1 animal até o 14º dia, repete-se a dose administrada em outros três animais. Se houver o óbito de 2-3 animais, o experimento seria realizado com doses sequenciais menores até possibilitar estimativa de uma faixa de DL50, conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS). Grupos compostos por três camundongos fêmeas receberam via oral o veículo e os extratos EHMP, EAMP e EMMP na dose de 2000 mg/kg. Os animais foram observados pelo método de *screening* hipocrático por uma hora após a administração oral. Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, ptose, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Durante 14 dias seguintes foram mensurados o consumo de água, ração e peso corporal. No último dia de observação, os animais foram anestesiados com Tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para análise hematológica. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, as vísceras

foram observadas macroscópica e os órgãos fígado, rim e baço foram pesados para cálculo do índice dos órgãos.

4.8.4 Determinação da atividade anti-inflamatória

4.8.4.1 Determinação da migração leucocitária pelo método de bolsão de ar

Este método foi realizado segundo Romano et al. (1997) modificado por Guerra et al. (2011). A bolsa de ar foi formada pela injeção subcutânea de 2,5 mL de ar estéril na região dorsal dos camundongos no dia 0, uma segunda injeção de ar estéril (2,5 mL) foi aplicada três dias depois. No sexto dia, grupos de cinco camundongos machos receberam por via oral EHMP, EAMP e EMMP nas doses de 30, 100, e 300 mg/kg; indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL da solução de carragenina a 1% (Sigma, EUA) na cavidade do bolsão de ar. Após 6 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, as bolsas foram lavadas com 3 mL de solução tampão fosfato contendo 3 µMol de EDTA. A contagem de leucócitos polimorfunucleares foi realizada em contador hematológico ABX Micros 60 (HORIBA, Kyoto, Japão). O extrato com melhor resultado nesse experimento foi escolhido para realização dos experimentos anti-inflamatórios.

4.8.4.1.1 Quantificação dos níveis de TNF- α e IL-1 β

Os exsudatos coletados do bolsão de ar foram centrifugados por 10 minuto a 3000 rpm, os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para a determinação dos níveis de citocinas. A quantificação dos níveis de TNF- α e IL-1 β foi realizado pela técnica de ELISA sandwich usando kits específicos para camundongos de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, California, USA). O limite de menor detecção deste ensaio foi de 10 pg/mL.

4.8.4.2 Avaliação do efeito antiedematogênico em modelo de edema de pata induzido por carragenina

Grupos de cinco ratos machos foram tratados por via oral com EAMP e EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) ou veículo 1 h antes da injeção da carragenina. O edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata posterior direita (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). O volume da pata foi medido nos intervalos de 0, 1, 2, 3,

4 h após a injeção de carragenina utilizando um pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi).

4.8.4.3 Avaliação do aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético a 1%

Camundongos machos foram tratados por via oral com EAMP e EMMP nas doses de 30, 100, e 300 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,3 mL de uma solução associada de cetamina a 10% e xilazina a 2% na proporção de 2:1. Imediatamente, os animais receberam 0,2 mL de azul de Evans 1% no plexo-orbital (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Uma hora após a o tratamento oral, 0,5 mL de ácido acético a 1% foi injetado por via intraperitoneal. Após trinta minutos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. A cavidade intraperitoneal foi lavada com 2 mL de solução salina (0,9% NaCl). O exsudato foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi distribuído em triplicata em placa de 96 poços. A absorbância das amostras foram medidas a 630 nm em leitor de placas e a concentração de azul de Evans foi calculada usando uma curva padrão deste corante (YESILADA et al., 1988).

4.8.5 Determinação da atividade hepatoprotetora contra intoxicação com acetaminofeno

Camundongos machos foram divididos em sete grupos de cinco animais e foram pré-tratados por via oral durante sete dias consecutivos com EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, silimarina (200 mg/kg) e salina (9% NaCl), como descrito abaixo. No oitavo dia, os camundongos receberam por gavagem acetaminofeno (250 mg/kg), exceto os grupos controle salina e EMMP satélite (MAMAT et al., 2013). Após 12 horas, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado a 4000 rpm por 10 minuto. O soro obtido foi analisado em BIO 2000 (BIOPLUS, São Paulo, Brasil) utilizando kits bioquímicos Labtest (São Paulo, Brasil) para os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP). Após a eutanásia, um lóbulo hepático de cada animal foi conservado em formalina tamponada a 10% para posterior análise histológica.

Grupo I – Controle negativo: solução salina (10 mL/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo II – Controle salina: solução salina (10 mL/kg) – não recebeu acetaminofeno

Grupo III – EMMP (30 mg/kg) + acetaminofeno 250 mg/kg

Grupo IV – EMMP (100 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo V – EMMP (300 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo VI – EMMP satélite (300 mg/kg) – não recebeu acetaminofeno

Grupo VII – Controle positivo silimarina (200 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

4.8.6 Determinação da toxicidade subcrônica em camundongos

Quatro grupos com 10 camundongos (5 fêmeas e 5 machos) receberam por via oral solução salina ou EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg durante 30 dias. Os animais foram avaliados diariamente para o consumo de água, ração, peso corporal e mortalidade (OLIVEIRA et al., 2013). Ao trigésimo dia do experimento, os camundongos foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg), e o sangue foi coletado em tubos contendo EDTA e analisadas em contador hematológico de células ABX micros 60 (HORIBE, Kyoto, Japão). No teste bioquímico, o sangue foi coletado em tubos com ativador de coágulo e centrifugados a 4000 rpm por 5 minutos. O soro obtido foi analisado em BIO 2000 (BIOPLUS, São Paulo, Brasil) utilizando kits bioquímicos Labtest (São Paulo, Brasil) para os seguintes parâmetros: glicose, proteínas totais, triglicérides, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, uréia e fosfatase alcalina (ALF). Para a análise histológica, amostras do fígado, baço e rins dos animais foram fixados em formalina tamponada a 10%. Após a desidratação dos tecidos em banhos sucessivos de álcool e diafanização com xilol, as peças foram incluídas em parafina. Cortes de 5µm de espessura foram colhidos em lâminas e coradas em hematoxilina e eosina. As fotomicrografias foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Desk Scanner (3DHistech, Budapeste, Hungria) equipado com o programa Panoramic Viewer (3DHistech).

4.8.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – uma via), seguida pelo teste de Bonferroni, exceto o modelo de edema de pata que foi avaliado através de ANOVA - duas vias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. As análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 PERFIL FITOQUÍMICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

As análises cromatográficas dos extratos de *M. prasina* revelaram a presença de cumarinas, terpenos e taninos em todos os extratos, e ausência de saponinas (Tabela 3). Antraquinona e flavonoides foram detectados em EAMP e EMMP, e alcaloide foram detectados apenas no EMMP. Leite (2016) investigou o perfil fitoquímico por CCD com sete espécies de *Miconia* revelou a presença de terpenoides no extrato hexânico, cumarinas no extrato acetato de etila, flavonoides e taninos nos extratos metanólicos. Estudos fitoquímicos de espécies da família Melastomataceae identificaram diversos metabólitos secundários como flavonoides (quercetina, miricetina e kaemferol), triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido arjunólico), cumarinas e esteróis (sitosterol, estigmasterol) (SERNA; MARTINEZ, 2015; CREVELIN et al., 2006; CELLOTTO et al., 2003; MACARI et al., 1990).

Tabela 3 – Perfil fitoquímico dos extratos de *Miconia prasina* por CCD.

Classe química	EHMP	EAMP	EMMP
Alcaloide	-	-	+
Antraquinona	-	+	+
Cumarinas	+	+	+
Flavonoides	-	+	+
Taninos	+	+	+
Terpenos	+	+	+
Saponinas	-	-	-

(-) ausência; (+) presença. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.2 DOSEAMENTO DE FENÓIS TOTAIS, TANINOS, FLAVONOIDES E CUMARINAS

O EMMP apresentou maior teor de fenóis totais e taninos em relação aos EHMP e EAMP (Tabela 4). A maioria dos constituintes químicos relatados na família Melastomataceae pertencem a compostos polifenólicos, com uma maior ocorrência de taninos hidrolisáveis (SERNA; MARTINEZ, 2015). O EAMP apresentou maior teor de flavonoides, enquanto que o EHMP apresentou maior teor de cumarina. Estudos fitoquímicos das folhas de *M. albicans* e *M. cabucu* identificaram os flavonoides quercetina, rutina, kampferol e miricetina (PIERONI et al., 2008; RODRIGUES et al., 2007). A composição química encontrada está de acordo com outras espécies do gênero.

Tabela 4 – Teor de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarina nos extratos de *M. prasina*.

Extratos	Fenóis Totais (mg EAT/g)	Taninos (mg EAT/g)	Flavonoides (mg ER/g)	Cumarina (mg EC/g)
EHMP	46,24 ± 0,76	14,17 ± 1,16	ND	470,29 ± 0,45
EAMP	97,56 ± 7,49	51,37 ± 4,25	287,31 ± 5,58	372,01 ± 17,81
EMMP	139,31 ± 8,69	77,44 ± 7,05	16,91 ± 1,63	250,30 ± 7,45

ND: não determinado; mg EAT/g - miligramas equivalentes de ácido tânico / g de extrato; mg ER/g - miligramas equivalentes de rutina / g de extrato; mg EC/g - miligramas equivalentes de cumarina / g de extrato. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELOS MÉTODOS DPPH, ABTS, COMPLEXO FOSFOMOLIBDÊNIO E FRAP.

A atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* pelos métodos DPPH, ABTS, complexo de fosfomolibdênio e FRAP estão na Tabela 5. DPPH e ABTS são métodos baseados no sequestro de radicais pela substância doadora de próton, a reação é seguida por uma alteração mensurável na espectrofotometria (FLOEGEL et al., 2011). O EMMP apresentou a maior capacidade de sequestro de radicais livres (CE_{50} 7,94 ± 0,04 µg/mL), seguido pelo EAMP (EC_{50} 34,04 ± 1,58 µg/mL). O EHMP não apresentou atividade antioxidante (DPPH CE_{50} > 500 µg/mL). O ácido ascórbico utilizado como controle positivo demonstrou CE_{50} 4,82 ± 0,06 µg/mL. A atividade de eliminação de radicais ABTS foi maior para o EMMP (55,47 ± 6,49%); seguido pelo EHMP (42,35 ± 3,02%) e EAMP (39,33 ± 0,13%). Pieroni et al. (2011) e Mosquera et al. (2009) demonstraram que os extratos metanólicos de *M. lehmannii*, *M. aeruginosa* e *M. albicans* possuem atividade antirradicalar pelo método DPPH. Flavonoides isolados de *M. alypifolia* apresentaram atividade antioxidante pelo sequestro de radicais ABTS (MANCINI et al., 2008).

A capacidade antioxidante total (CAT) é um ensaio espectrofotométrico baseado na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) pela ação de uma substância antioxidante com a subsequente formação do complexo fosfato/molibdênio (V) com coloração verde (PRIETO et al., 1999). A capacidade antioxidante total foi maior em EAMP (72,72 ± 1,23%), seguido pelo EMMP (67,28 ± 5,67%) e EHMP (50,30 ± 2,69%).

O método FRAP se baseia na redução do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) férrico, de $[Fe^{3+}-(TPZT)_2]^{3+}$ para $[Fe^{2+}-(TPZT)_2]^{2+}$, o qual apresenta coloração azul intensa em meio ácido (pH 3,6) (BENZIE; STRAIN, 1996). EHMP e EAMP apresentaram baixo poder de redução do Fe^{+3} , enquanto que EMMP apresentou alto nível de sulfato de ferro.

Tabela 5 – Atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* pelo método DPPH, ABTS, Fosfomolibdênio e FRAP.

Extratos	DPPH EC₅₀ (µg/mL)	ABTS⁺ (%)	Fosfomolibdênio (% CAT)	FRAP (µ FeSO₄/mg de extrato)
EHMP	> 500	42,35 ± 3,02	50,30 ± 2,69	2,66 ± 0,09
EAMP	34,04 ± 1,58	39,33 ± 0,13	72,72 ± 1,23	3,35 ± 0,67
EMMP	7,94 ± 0,04	55,47 ± 6,49	67,28 ± 5,67	15,86 ± 0,92
Trolox	-	64,20 ± 0,10	-	24,70 ± 0,41
Ácido Ascórbico	4,82 ± 0,06	-	-	-

Valores de CE₅₀ foram obtidos a partir da análise de regressão linear, com 95% de nível de confiança. Valores em médias ± desvio padrão. FRAP: Poder antioxidante de redução do Ferro. % CAT: Porcentagem da capacidade antioxidante total. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Todos os extratos de *M. prasina* apresentaram atividade antioxidante, contudo analisando os resultados obtidos pelos quatro métodos antioxidantes, verifica-se que o EMMP apresentou maior capacidade de sequestro de radicais livres e poder redutor do ferro. Ao comparar os resultados do teor de fenóis totais com a atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* foi possível observar que o maior conteúdo de compostos fenólicos no EMMP resultou em um aumento na atividade antioxidante.

Os compostos fenólicos, representados principalmente por taninos e flavonoides, destacam-se como os principais grupo de antioxidantes naturais, pois atuam como sequestradores eficientes de radicais livres, doadores de átomos de hidrogênios ou elétrons e quelantes de metais. Estas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (PYRZYNSKA; BIESAGA, 2009; BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

5.4 TOXICIDADE AGUDA

Na avaliação da toxicidade não foram detectadas alterações na atividade geral, consciência, coordenação motora, tônus muscular e reflexos após a administração dos extratos de *M. prasina*. Não houve a ocorrência de morte durante o experimento, nem mudanças nos parâmetros fisiológicos observados (Tabelas 6). Os órgãos, fígado, rim e baço não mostraram alterações macroscópicas, nem no índice dos órgãos das mesmas vísceras. Nenhum dos extratos alterou os parâmetros hematológicos após 14 dias da administração (Tabela 7).

Tabela 6 – Efeito tóxico da administração oral dos extratos de *M. prasina*.

Grupo	Consumo diário		Peso(g)		Índice dos órgãos (mg/g)		
	Ração (g)	Água (mL)	Inicial	Final	Fígado	Rim	Baço
Controle	17,3 ± 2,23	28,6 ± 5,69	27,8 ± 1,33	31,8 ± 2,15	57,1 ± 5,74	5,2 ± 0,50	6,2 ± 1,16
EHMP	18,9 ± 2,41	27,9 ± 4,37	27,3 ± 0,65	31,56 ± 1,98	53,6 ± 3,67	5,2 ± 0,20	5,2 ± 1,07
EAMP	16,5 ± 2,78	26,8 ± 4,21	28,2 ± 0,75	31,58 ± 1,40	58,5 ± 4,21	5,5 ± 0,40	6,4 ± 0,52
EMMP	17,2 ± 3,80	30,0 ± 4,80	28,7 ± 1,80	31,9 ± 2,54	62,5 ± 4,53	5,4 ± 0,30	6,2 ± 1,03

Valores expressos em média ± DP. (N = 6). ANOVA uma via, teste de Bonferroni. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A avaliação da toxicidade aguda é uma metodologia amplamente empregada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de provocar danos e letalidade aos organismos vivos (VALADARES, 2006; ZATTA et al., 2009). De acordo com a metodologia empregada, os extratos de *M. prasina* não produziram sinais de intoxicação e nem alterações comportamentais, fisiológicas ou hematológicas. O valor da DL50 para a administração oral destes extratos foi estimado em maior que 2000 mg/kg, enquadrando-se na Categoria 5 de toxicidade segundo a OECD (2001).

Tabela 7 – Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre parâmetros hematológicos.

Parâmetros	Controle	EHMP	EAMP	EMMP
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,8 ± 0,78	7,4 ± 0,70	8,8 ± 0,80	8,8 ± 0,72
Hemoglobina (g/dL)	12,6 ± 1,13	10,6 ± 0,69	11,7 ± 0,92	12,9 ± 1,02
Hematócrito (%)	36,2 ± 2,72	36,0 ± 3,62	39,2 ± 4,43	34,6 ± 2,84
VCM (µg)	48,5 ± 1,43	47,2 ± 2,04	47,2 ± 1,94	48,6 ± 1,57
HCM (pg)	15,2 ± 1,43	14,7 ± 1,03	13,9 ± 1,14	13,3 ± 1,15
CHCM (%)	30,8 ± 2,53	31,1 ± 2,53	29,6 ± 2,48	35,6 ± 3,69
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	8,0 ± 0,55	7,2 ± 0,90	7,9 ± 0,81	8,8 ± 0,72

Valores expressos em média ± D.P. (n=5). ANOVA uma via, teste de Bonferroni. HCM - Hemoglobina corpuscular média; CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM - Volume corpuscular médio. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e o controle. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.5 DETERMINAÇÃO DA MIGRAÇÃO LEUCOCITÁRIA PELO MÉTODO DE BOLSÃO DE AR

Os extratos de *M. prasina* nas doses 30, 100 e 300 mg/kg reduziram a migração de leucócitos para a bolsão de ar (Tabela 8), principalmente o EMMP, que obteve a maior porcentagem de inibição na dose de 300 mg/kg (74%). A indometacina inibiu a migração celular para a cavidade do bolsão em

84 %. O modelo de bolsão de ar induzido por carragenina é caracterizado pela formação de uma membrana fina constituída por fibroblastos, macrófagos e mastócitos (EDWARDS; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1981, SIN; SEDGWICK; WILLOUGHBY, 1986), com infiltração polimorfonuclear e liberação de fármacos pró-inflamatórios tais como a PGE2, a IL-6, a IL-1 e TNF- α . Este modelo tem sido amplamente utilizado para a pesquisa de fármacos antiartríticos (SEDGWICK; LEES, 1986).

Tabela 8 – Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre a migração celular em bolsão de ar.

Grupo	Dose (mg/kg)	Migração Celular (10³ / mm³)	Inibição (%)
Controle	-	17,7 \pm 1,07	-
EHMP	30	9,42 \pm 0,90 ****	47
	100	7,12 \pm 0,64 ****	60
	300	6,52 \pm 0,64 ****	63
EAMP	30	8,02 \pm 0,49 ****	55
	100	6,54 \pm 0,34 ****	63
	300	5,44 \pm 0,59 ****	69
EMMP	30	9,16 \pm 0,67 ****	48
	100	6,57 \pm 0,69 ****	63
	300	4,66 \pm 0,30 ****	74
Indometacina	10	2,88 \pm 0,54 ****	84

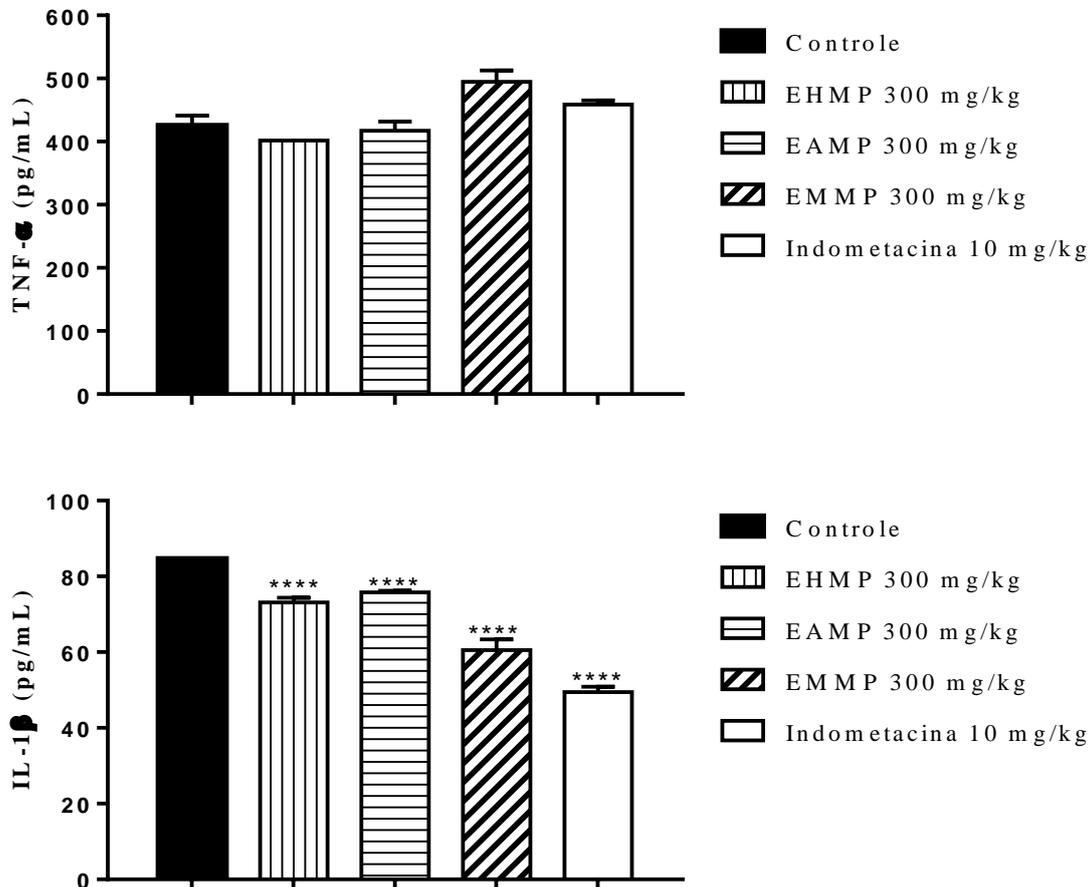
Valores expressos em média \pm DP. (N = 5). **** p < 0,0001 vs Controle. ANOVA uma via, teste de Bonferroni. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE TNF- α E IL-1 β

EHMP, EAMP e EMMP na dose de 300 mg/kg e a indometacina não reduziram os níveis de TNF- α , porém reduziram os níveis de IL-1 β (Figura 6). A IL-1 β é um componente importante das respostas inflamatórias e imunes. A IL-1 β atua sinergicamente com TNF- α aumentando a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, promovendo a diapedese de leucócitos na resposta inflamatória aguda; a liberação do conteúdo específico dos grânulos de neutrófilos humanos, a síntese de outra interleucina por monócitos e induz a produção de várias enzimas, tais como a fosfolipase A2, a COX-2 e a iNOS, levando à liberação de PGE2 e NO, o que contribui para respostas

inflamatórias locais e sistêmicas (GABAY; LAMACCHIA; PALMER, 2010; MOURA; POMERANTZEFF; GOMES, 2001).

Figura 6– Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre os níveis de citocinas no exsudato inflamatório



Dados representam média \pm DP, (N=5); **** $p < 0,0001$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.7 EFEITO ANTIEDEMATOGÊNICO EM MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O pré-tratamento com o EAMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg reduziram o volume do edema induzido por carragenina, destacando-se a dose de 300 mg/kg que apresentou atividade similar a indometacina na primeira (62 %) e segunda (70 %) hora após a indução da inflamação. O EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg reduziram o volume do edema induzido por carragenina a 1% (Tabela 9). Na primeira hora, todas as doses apresentaram atividade similar a indometacina. Contudo, somente a dose de 300 mg/kg atuou semelhante a indometacina em todas as medições.

A inflamação induzida por carragenina na pata do rato representa um modelo clássico de formação de edema e hiperalgesia, que tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de

fármacos anti-inflamatórios não esteróides (GUAY et al., 2004). O desenvolvimento de edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com a atuação de vários mediadores para produzir a resposta inflamatória (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969). Na primeira fase (0-1 h) ocorre a liberação de histamina, serotonina e bradicinina (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971), que promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A fase secundária (após 1 h) está correlacionada com a ativação da COX-2 levando a uma elevada produção de PGE₂ (SEIBERT et al., 1994, DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971). Esta fase envolve também a infiltração de neutrófilos e a liberação de outros mediadores importantes, tais como TNF- α , IL-1 β e NO (MORRIS, 2003, SALVEMINI et al., 1996, VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969). Nossos resultados mostraram que os EAMP e EMMP foram eficazes na redução do edema de pata nas duas fases da inflamação induzidas pela carragenina. Com base nesta observação, o efeito anti-inflamatório demonstrado pelos extratos podem ser atribuído à inibição da liberação de mediadores pro-inflamatórios, tais como histamina, prostaglandinas, IL-1 β e NO.

Tabela 9 – Efeito de EAMP e EMMP sobre edema de pata induzido por carragenina em ratos

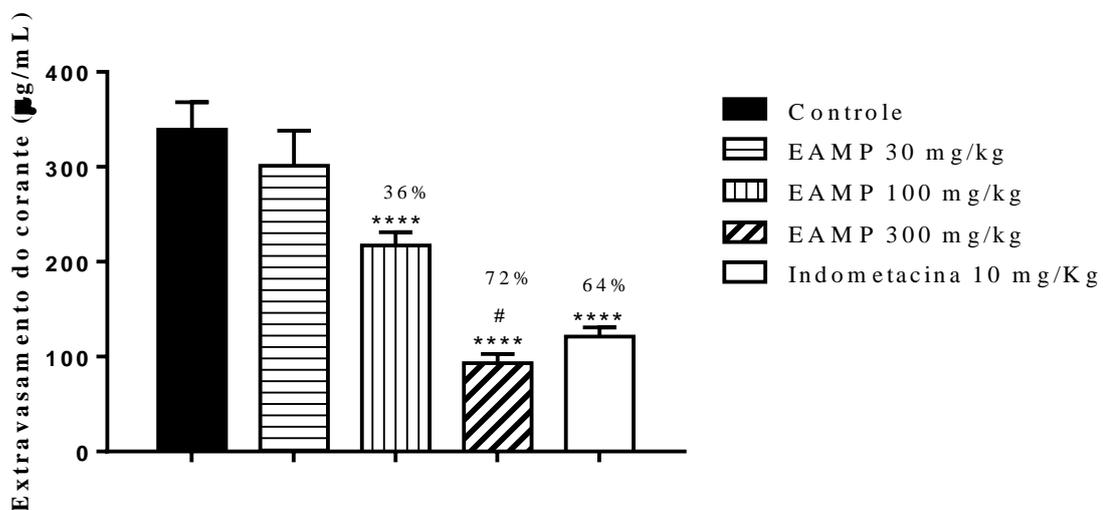
Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do edema de pata (mL)			
		1h	2h	3h	4h
Controle	-	0,45 ± 0,08	0,94 ± 0,10	1,38 ± 0,06	1,34 ± 0,11
EAMP	30	0,32 ± 0,03 (29%)	0,83 ± 0,09 (12%)	1,07 ± 0,10**** (22%)	0,99 ± 0,09**** (26%)
	100	0,30 ± 0,04* (33%)	0,64 ± 0,09**** (32%)	0,93 ± 0,12**** (33%)	0,86 ± 0,10**** (36%)
	300	0,17 ± 0,02****# (62%)	0,28 ± 0,05****# (70%)	0,76 ± 0,06**** (45%)	0,65 ± 0,08**** (51%)
EMMP	30	0,22 ± 0,02****# (51%)	0,45 ± 0,07**** (52%)	0,71 ± 0,12**** (49%)	0,63 ± 0,07**** (53%)
	100	0,16 ± 0,01****# (64%)	0,35 ± 0,03****# (63%)	0,60 ± 0,06**** (57%)	0,51 ± 0,07**** (62%)
	300	0,13 ± 0,06****# (71%)	0,30 ± 0,07****# (68%)	0,48 ± 0,02****# (65%)	0,50 ± 0,08****# (62%)
Indometacina	10	0,11 ± 0,02**** (75%)	0,27 ± 0,06**** (71%)	0,42 ± 0,07**** (70%)	0,52 ± 0,01**** (61%)

Dados representam média ± DP volume do edema (mL) nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina a 1%. (N=5); * $p < 0,05$, **** $p < 0,0001$ v.s Controle. # - não significativo v.s indometacina. ANOVA duas vias seguido do teste de Bonferroni. EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.8 AUMENTO DA PERMEABILIDADE VASCULAR INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO

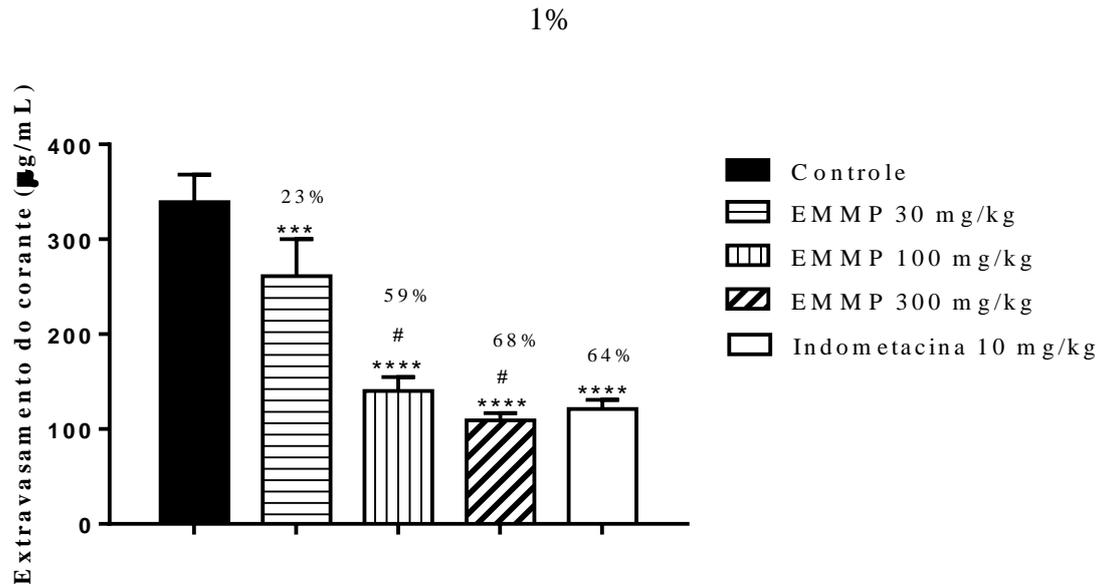
O pré-tratamento com o EAMP inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético (Figura 7). A dose de 300 mg/kg do EAMP (72 %) demonstrou atividade similar a indometacina (64 %). Os grupos tratados com EMMP reduziram significativamente a exsudação do corante azul de Evans para cavidade intraperitoneal (Figura 8). O extrato metanólico nas doses de 100 (23 %) e 300 mg/kg (69 %) atuaram semelhante a indometacina (64%).

Figura 7 – Efeito do EAMP sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1%



Dados representam média \pm DP do extravasamento do corante azul de Evans ($\mu\text{g/mL}$) 30 minutos após a injeção de ácido acético a 1%. (N=5); **** $p < 0,0001$ v.s Controle. # - não significativo v.s indometacina. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*.

Corroborando com os resultados anteriores, o EAMP e EMMP inibiram o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético. O ácido acético provoca uma inflamação exsudativa iniciada pela liberação de mediadores endógenos como prostaglandinas, histamina, bradicinina e serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH (FRANÇA et al., 2001, GUO et al., 2008). A inibição destes mediadores contribuem para reduzir a vasodilatação, a permeabilidade vascular, a formação do edema e inibe a migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (WHITTLE, 1964).

Figura 8– Efeito do EMMP sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Dados representam média \pm DP do extravasamento do corante azul de Evans ($\mu\text{g/mL}$) 30 minutos após a injeção de ácido acético a 1% ($N=5$); *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ v.s Controle. # - não significativo v.s indometacina. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

5.9 ATIVIDADE HEPATOPROTETORA CONTRA INTOXICAÇÃO COM ACETAMINOFENO

O fígado é um órgão importante no metabolismo e desintoxicação de diversas substâncias (STARR; HAND, 2002). Apesar de sua capacidade regenerativa, exposições contínuas a xenobióticos, poluentes ambientais e agentes quimioterápicos podem superar os mecanismos naturais de proteção do fígado, levando ao mal funcionamento e a lesões (ARHOGHRO et al., 2009). Durante a biotransformação do fármaco nos hepatócitos há a formação contínua de radicais livres. Estas moléculas instáveis reagem rapidamente com outras moléculas, acarretando na peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, rupturas de cadeias de DNA e modulação da expressão gênica (MCCORD, 2000). Evidências experimentais mostram que esses radicais livres estão envolvidos em doenças hepáticas e também podem levar a aterosclerose, câncer, acidente vascular cerebral, asma e artrite (LIAO; YIN, 2000; HIKINO; KISO, 1988). Plantas são fontes ricas em moléculas com potencial de neutralizar os radicais livres e inibir a sua produção. É um fato bem estabelecido que o mecanismo hepatoprotetor de certos fármacos está relacionado com a sua capacidade antioxidante pois eliminam os radicais livres e espécies reativas de oxigênio (AHMADI et al., 2011).

Para avaliar a atividade hepatoprotetora de *M. prasina* foi escolhido o extrato com melhor atividade antioxidante e anti-inflamatória. Os dados na tabela 10 mostram que 12 h após a administração de acetaminofeno os camundongos desenvolveram dano hepatocelular, isto foi observado pelo aumento significativo na atividade sérica das enzimas ALT, AST e fosfatase alcalina.

A elevação dos níveis séricos de transaminases (AST e ALT) e fosfatase alcalina são indicadores de dano hepático, uma vez que estas estão normalmente localizadas no citoplasma e são liberadas na circulação sanguínea após lesão celular (COUTO et al., 2008).

O pré-tratamento com EMMP (30, 100 e 300 mg/kg) não reduziu os níveis séricos de ALT, AST e fosfatase alcalina em comparação ao grupo controle negativo. A silimarina (200 mg/kg) reduziu os níveis das enzimas hepáticas indicando efeito hepatoprotetor. Para avaliar a hepatotoxicidade do EMMP, os grupos controle salina e EMMP satélite não receberam acetaminofeno. O EMMP satélite apresentou níveis de enzimas hepáticas semelhante aos níveis do grupo controle salina. Estes resultados comprovam que o extrato metanólico não induziu toxicidade hepática quando administrado por 7 dias na dose de 300 mg/kg.

Tabela 10 - Efeitos de EMMP sobre enzimas hepáticas na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno.

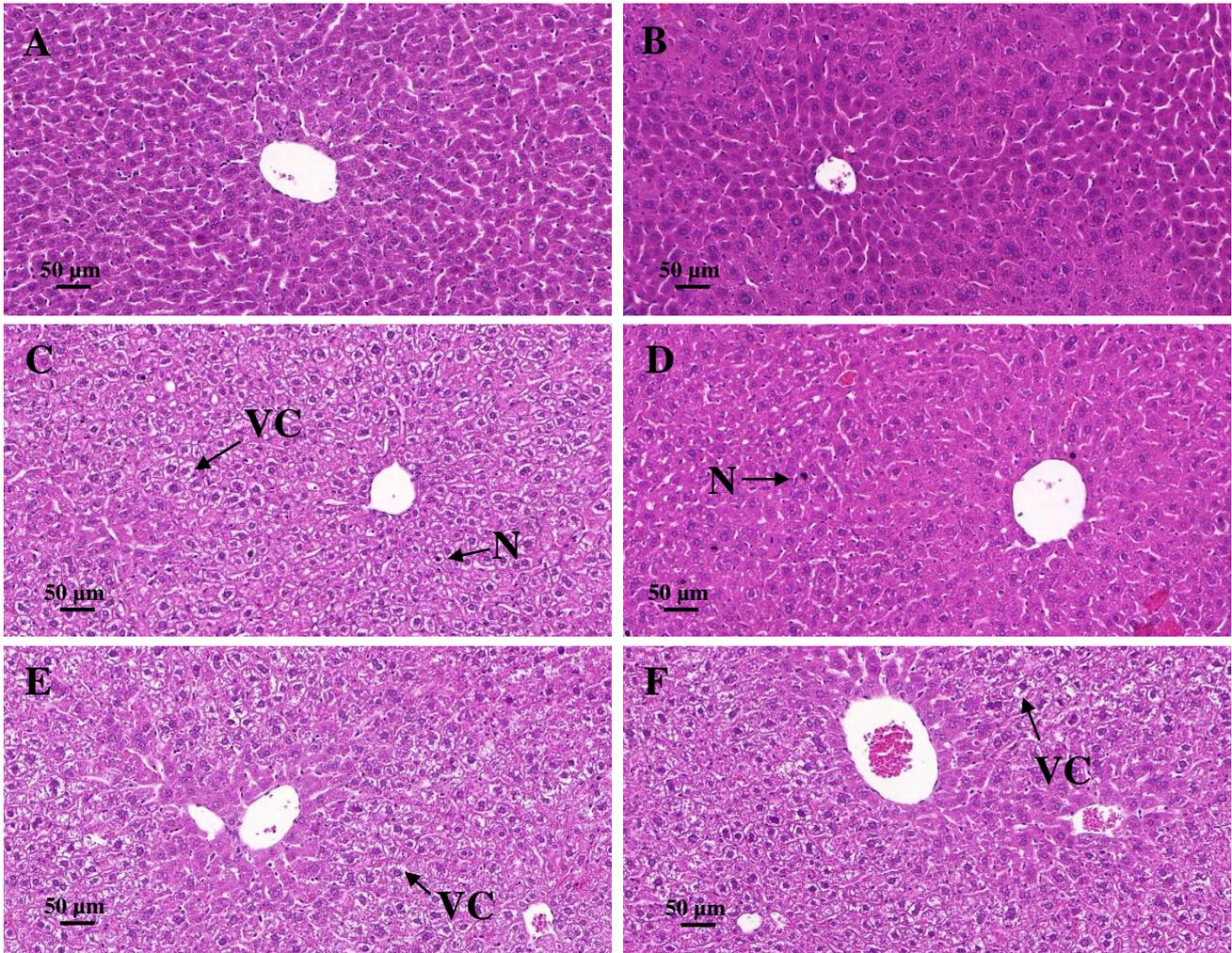
Grupos	Dose	AST	ALT	ALF
	(mg/kg)	(U/L)	(U/L)	(U/L)
Controle negativo	-	238,2 ± 15,20	118,0 ± 16,23	238,4 ± 26,49
Controle salina	-	116,0 ± 12,57****	61,2 ± 4,54****	153,8 ± 13,7****
EMMP	30	231,2 ± 38,54	104,7 ± 9,24	221,6 ± 35,43
	100	218,6 ± 26,46	100,5 ± 7,89	233,3 ± 22,59
	300	226,0 ± 6,52	104,5 ± 6,35	230,4 ± 20,01
EMMP satélite	300	125,5 ± 14,69****#	54,5 ± 4,18****#	157,2 ± 12,97****#
Silimarina	200	180,3 ± 17,04**	90,0 ± 6,63****	182,6 ± 12,88*

Dados representam média ± DP dos níveis séricos de enzimas hepáticas 12 h após a indução de toxicidade por acetaminofeno (250 mg/kg). (N=6) * p <0,05; *** p <0,001; ****P<0,0001 v.s controle negativo. # - não significativo v.s controle salina. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase e ALF: fosfatase alcalina. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A análise histopatológica do fígado dos grupos controle salina e EMMP satélite apresentou arquitetura hepática normal com células hepáticas distintas, espaços sinusoidais e veia central normais (Figuras 9A e 9B). O grupo controle negativo induzido com acetaminofeno apresentou alterações histopatológicas severas, como necrose hepática centrilobular, vacuolização citoplasmática, núcleo picnótico, estreitamento de capilares sinusoidais e arquitetura dos hepatócitos desorganizada (Figura 9C). EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg não evitou estas alterações histopatológicas associadas à hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno (Figura 9E e 9F).

O pré-tratamento com silimarina (200 mg/kg) preservou a arquitetura normal dos hepatócitos e reduziu os sinais de danos hepáticos (Figura 9D). Silimarina é o nome genérico de um grupo de compostos naturais (silibina, silidianina e silicristina) extraída do fruto e sementes de *Silybum marianum* com utilizado no manejo da doença hepática e falhas hepáticas induzidas por toxina (SCORTICATI et al., 2004).

Figura 9 – Efeito da toxicidade hepática induzida por acetaminofeno em camundongos



Fotomicrografia hepática de camundongos submetidos a intoxicação com acetaminofeno (250 mg/kg), HE, 20X. (A) Controle salina; (B) EMMP satélite; (C) Controle negativo; (D) Silimarina 200 mg/kg; (E) EMMP 100 mg/kg; EMMP 300 mg/kg. VC: vacuolização citoplasmática; N: núcleo com picnose. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno ocorre através de uma reação de biotransformação que forma o metabolito reativo N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) através da ativação do citocromo P450 do sistema oxidase. O metabolito é normalmente desintoxicado através de uma reação de conjugação com a glutathiona reduzida (GSH). No entanto, em altas doses de acetaminofeno, os níveis de NAPQI aumentam esgotando os níveis de GSH. Posteriormente, os grupos sulfidriolo de proteínas hepáticas podem reagir com o metabolito reativo, resultando em

necrose hepática (JAESCHKE; MITCHELL, 1989; LASKIN; PILARO,1986). A degeneração hepatocelular e a necrose também estão associadas a marcadores enzimáticos elevados, como alanina ALT e AST, que indicam hepatotoxicidade (CIGREMIS; TUREL; ADIGUZEL, 2009).

Os extratos brutos são constituídos por uma variedade de compostos que podem afetar os sistemas biológicos através de interações com múltiplos alvos celulares. Estes compostos podem apresentar sinergismo, aumentando o efeito farmacológico. No entanto, a mistura de diferentes compostos também pode levar a efeitos inibitórios, onde um componente pode reduzir a atividade biológica do outro (HAMMER et al., 2007).

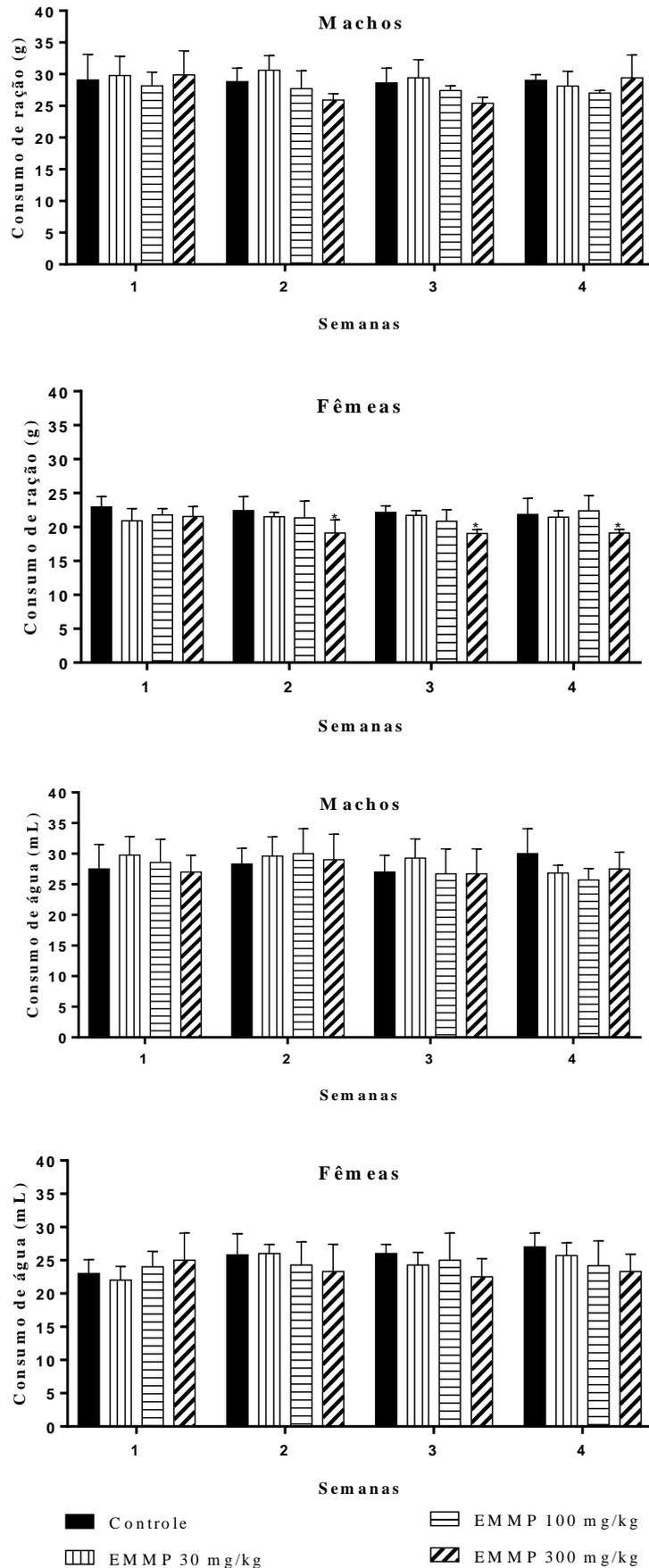
O EMMP mostrou atividade antioxidante *in vitro*, no entanto, não impediu a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno. Os resultados sugerem que EMMP pode ter componentes antagonistas que reverteram os efeitos antioxidantes no modelo *in vivo*. Contudo, devem ser realizados estudos adicionais para identificar o composto ativo responsável pela atividade antioxidante do EMMP.

5.10 EFEITO DA TOXICIDADE SUBCRÔNICA EM CAMUNDONGOS.

A administração oral do EMMP não causou mortalidade em nenhum dos grupo ao longo do período experimental. Igualmente, nenhuma alteração em relação ao screening hipocrático foi observada, sendo o comportamento do grupo tratado semelhante ao do grupo controle em todas as doses testadas. O screening hipocrático fornece uma estimativa geral de natureza farmacológica e toxicológica de uma substância sobre o estado de consciência e disposição, atividade e coordenação motora, reflexos, atividade do sistema nervoso central e autônomo (LUCIO et al., 2000; MALONE; ROBICHAUD, 1962).

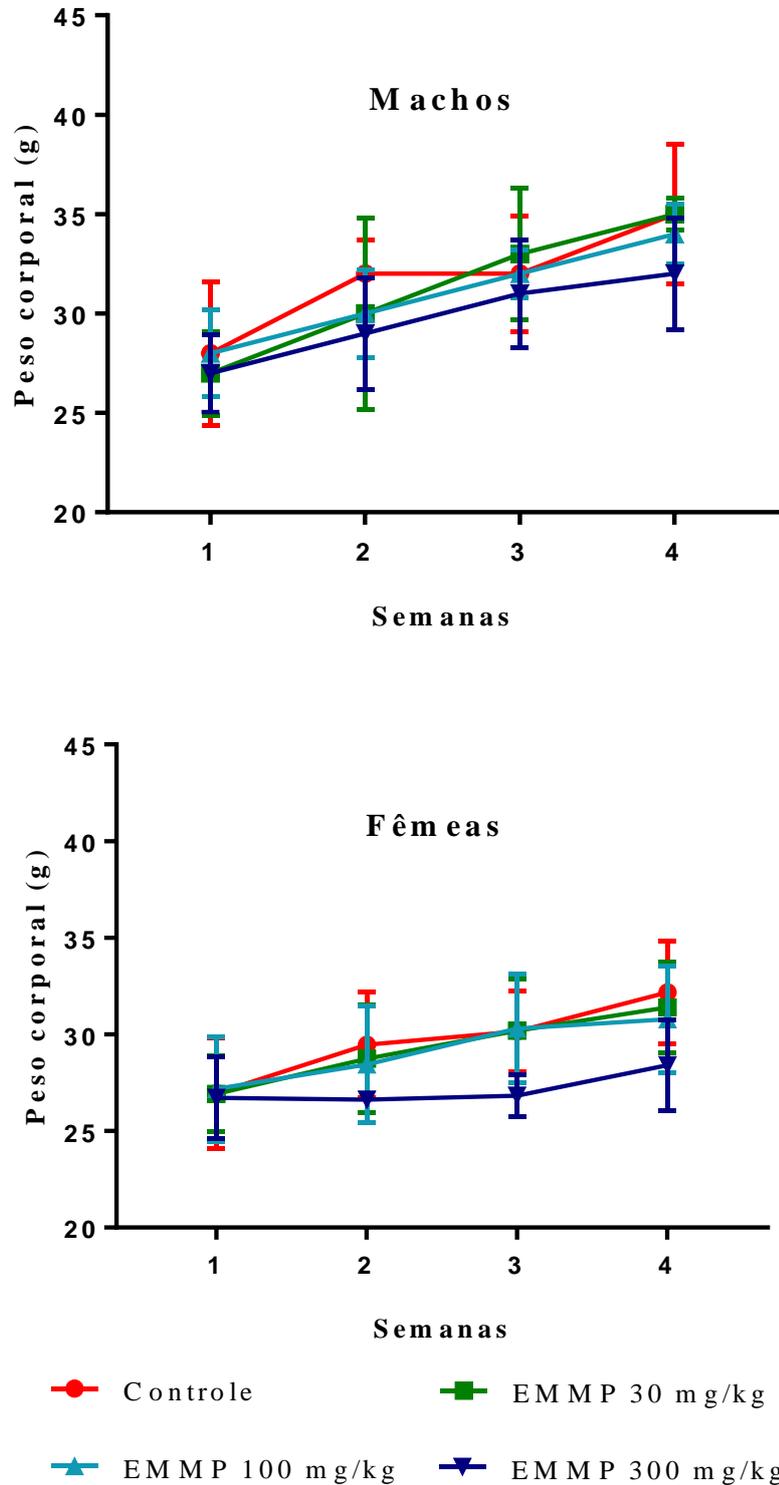
A toxicidade sistêmica de uma substância também pode ser avaliada por meio da redução nos consumos de água e ração, em conjunto com as alterações no peso corporal, alterações comportamentais, má condição de pelagem e apatia (ROCHA et al., 2012; GONZÁLEZ; SILVA, 2003; MELO, 2001). O grupo com as fêmeas tratadas com EMMP na dose de 300 mg/kg apresentou redução no consumo de ração (Figura 10), contudo o consumo de água e o ganho de peso não foram alterados (Figura 11). Os demais grupos não apresentaram mudanças no consumo de ração e água.

Figura 10 - Efeito da administração oral EMMP sobre o consumo de ração e água.



Os valores são expressos como a média do consumo de ração e água \pm DP. * $p < 0,05$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Figura 11 - Peso corporal médio de camundongos machos e fêmeas administrados com EMMP durante 30 dias.



Os valores são expressos como a média do peso corporal para a semana \pm DP (n = 5). ANOVA uma via seguido pelo testes de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *Miconia prasina*.

A administração de EMMP não alterou os parâmetros hematológicos avaliados, exceto os grupos tratados com as doses de 100 e 300 mg/kg que reduziram o número de leucócitos na circulação

sanguínea de camundongos machos (Tabela 11). Os leucócitos são um grupo de células produzidos na medula óssea que participam ativamente do sistema imunológico humano, auxiliando na defesa do organismo no combate a invasores (VOGADO; VERAS; LINS, 2016). Apesar do EMMP ter reduzido o número de leucócitos na corrente sanguínea, esta redução não foi acentuada, portanto isto não constituiu um alto risco a saúde, no entanto, níveis muito baixos de leucócitos podem levar a uma maior propensão a infecções.

Tabela 11 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros hematológicos.

	Controle	EMMP		
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
Machos				
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,0 ± 0,96	9,3 ± 0,54	8,7 ± 0,62	8,0 ± 0,52
Hemoglobina (g/dL)	13,1 ± 0,71	14,1 ± 0,70	13,2 ± 1,01	12,6 ± 0,55
Hematócrito (%)	42,8 ± 2,57	46,1 ± 2,49	43,5 ± 1,32	41,1 ± 2,36
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	681 ± 116,51	658 ± 102,81	607 ± 74,70	739 ± 59,00
VCM (μg)	52,5 ± 2,64	49,6 ± 1,14	51,2 ± 2,52	51,2 ± 2,22
HCM (pg)	15,7 ± 0,92	15,2 ± 0,53	16,7 ± 1,80	15,7 ± 0,49
CHCM (%)	32,4 ± 3,61	30,7 ± 0,76	32,6 ± 1,75	30,6 ± 0,70
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,9 ± 0,92	7,0 ± 0,78	5,1 ± 0,91***	4,7 ± 0,92*****
Fêmeas				
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,7 ± 0,77	8,8 ± 0,66	9,0 ± 0,33	8,7 ± 1,38
Hemoglobina (g/dL)	13,6 ± 0,88	13,6 ± 0,91	13,8 ± 1,12	14,4 ± 0,22
Hematócrito (%)	43,7 ± 4,43	44,1 ± 3,77	46,3 ± 0,81	38,9 ± 4,38
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	795 ± 17,79	798 ± 49,50	742 ± 44,55	684 ± 61,04
VCM (μg)	50,2 ± 1,10	50,0 ± 1,58	51,3 ± 1,15	53,0 ± 1,41
HCM (pg)	15,6 ± 0,52	15,6 ± 0,90	15,9 ± 0,64	14,5 ± 0,44
CHCM (%)	31,3 ± 1,26	31,7 ± 1,84	31,2 ± 0,55	29,3 ± 2,62
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,3 ± 0,85	6,0 ± 1,78	6,2 ± 0,61	6,3 ± 1,26

Valores expressos em média ± D.P. (n=5). *** $p < 0,001$, ***** $p < 0,0001$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni. HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM: Volume corpuscular médio; EMMP: Extrato metanólico de *Miconia prasina*.

A avaliação bioquímica sérica fornece informações importantes sobre alterações no metabolismo de macromoléculas, sendo amplamente utilizados como indicadores ou marcadores de dano nas células hepáticas e de sobrecarga renal (CHENOWETH; HAKE, 1962). A análise

bioquímica revelou que nenhum dos parâmetros avaliados foram alterados pela administração de EMMP (Tabela 12).

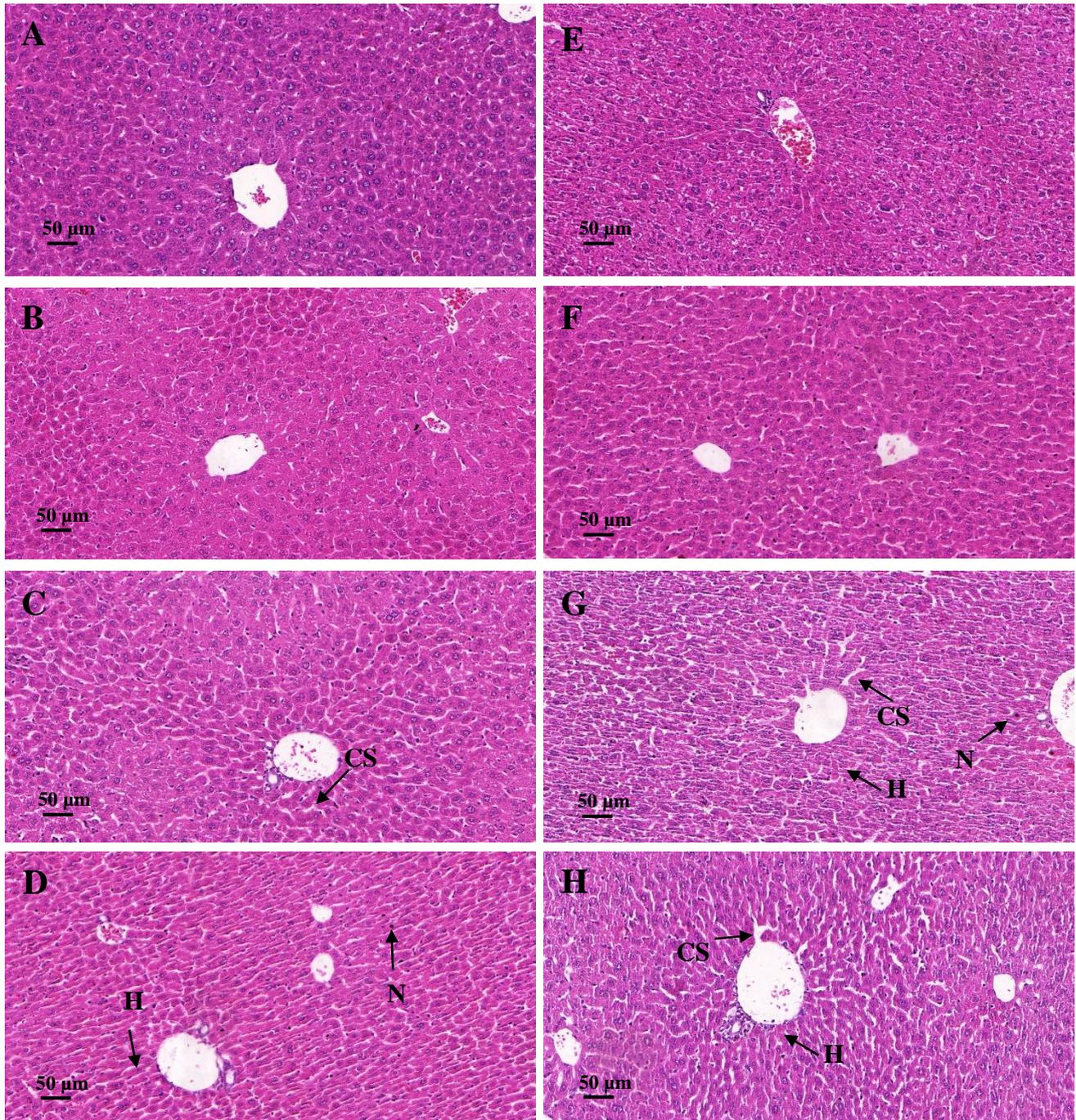
Tabela 12 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros bioquímicos.

Machos	Controle		EMMP	
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	148,5 ± 15,93	127,0 ± 18,92	133,5 ± 16,36	153,7 ± 13,63
Triglicérides (mg/dL)	153,0 ± 17,33	155,8 ± 11,41	153,7 ± 6,13	140,8 ± 23,02
Colesterol (mg/dL)	82,2 ± 6,34	84,5 ± 10,44	83,3 ± 6,97	85,3 ± 10,98
Proteínas torais (g/dL)	5803 ± 282	5887 ± 619	5892 ± 208	6047 ± 240
Creatinina (mg/dL)	0,33 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,28 ± 0,04
Uréia (mg/dL)	74,0 ± 3,67	68,0 ± 4,97	69,3 ± 2,94	68,57 ± 6,02
Fosfatase alcalina (U/L)	213,0 ± 26,34	207,0 ± 38,10	209,0 ± 28,80	205,2 ± 19,49
ALT (U/L)	71,3 ± 2,89	68,5 ± 7,70	76,7 ± 6,29	71,2 ± 4,38
AST (U/L)	115,0 ± 6,12	129,6 ± 18,70	130,5 ± 11,27	135,0 ± 13,79
Fêmeas				
Glicose (mg/dL)	136,5 ± 17,63	120,6 ± 19,27	146,2 ± 15,32	129,4 ± 7,09
Triglicérides (mg/dL)	108,3 ± 14,61	106,0 ± 12,71	110,6 ± 11,91	107,4 ± 12,09
Colesterol (mg/dL)	67,6 ± 6,54	69,3 ± 4,72	69,6 ± 3,97	67,8 ± 12,03
Proteínas torais (g/dL)	5352 ± 283	5484 ± 389	5617 ± 349	5381 ± 282
Creatinina (mg/dL)	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,05
Uréia (mg/dL)	68,3 ± 3,50	63,0 ± 6,48	67,2 ± 6,30	67,2 ± 5,31
Fosfatase alcalina (U/L)	190,7 ± 37,21	181,8 ± 20,40	200,7 ± 41,42	213,0 ± 10,07
ALT (U/L)	58,2 ± 9,34	55,5 ± 7,80	62,6 ± 7,60	62,2 ± 6,53
AST (U/L)	127,2 ± 8,00	130,5 ± 17,89	129,2 ± 12,31	151,33 ± 5,51

Valores expressos em média ± D.P. (n=5). ANOVA uma via seguido pelo testes de Bonferroni. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A análise histológica foi realizada para identificar possíveis alterações microscópicas no fígado, rim e baço. Os grupos controles fêmeas e machos apresentaram estrutura hepática conservada, sem alterações vasculares no espaço-porta, veia centrolobular e capilares sinusóides (Figura 12A e 12E). Os camundongos de ambos os sexos administrados com o EMMP na dose de 30 mg/kg apresentaram hepatócitos preservados, com veia centrolobular, espaço-porta e capilares sinusóides sem alterações (Figura 12B e 12F). Nos grupos tratados com EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg observou-se a arquitetura dos hepatócitos desorganizada, núcleo com picnose, aumento do calibre vascular do espaço-porta, veia centrolobular e capilares sinusóides (Figura 12C e 12G; 12D e 12H).

Figura 12 - Fotomicrografia hepática de camundongos tratados com EMMP por 30 dias.

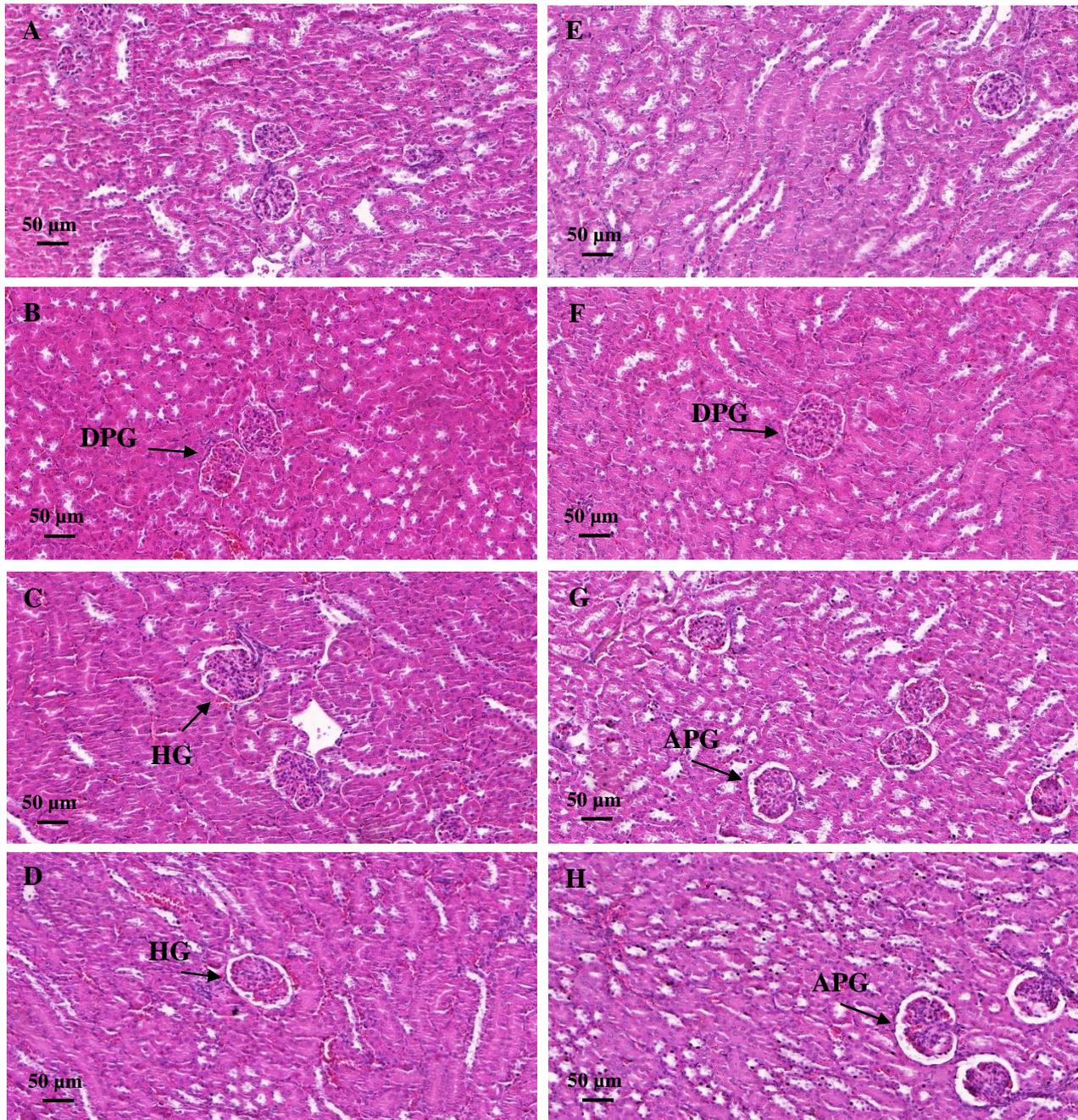


Fotomicrografia hepática de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) administrados com o extrato metanólico de folhas de *M. prasina* durante 30 dias, HE, 20X. Controle (A e E); EMMP 30 mg/kg (B e F); EMMP 100 mg/kg (C e G); EMMP 300 mg/kg (D e H). CS: capilares sinusoidais com aumento do calibre vascular; N: núcleo com picnose; H: arquitetura do hepatócito desorganizada; EMMP: extrato metanólico de *Miconia prasina*.

O fígado tem a função de manter a homeostasia metabólica do corpo, sendo um dos órgãos mais afetados por lesões provocadas por agentes químicos devido a sua importante participação na biotransformação de substâncias no organismo (SCHINONI, 2006). Apesar das alterações estruturais presentes nas amostras microscópicas, estas modificações não foram acompanhada de alterações nos níveis séricos de ALT e AST, indicando que a administração subcrônica do EMMP não causou danos hepáticos graves.

Em relação aos rins, os grupos controles fêmeas e machos apresentaram estrutura renal preservada, sem alterações nos glomérulos, no espaço periglomerular e túbulos renais (Figura 13A e 13E). O EMMP na dose de 30 mg/kg apresentou glomérulos e túbulos renais conservados, com redução do espaço periglomerular (Figura 13B e 13F). Nos camundongos machos e fêmeas administrados com EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg foram observados hidropsia dos túbulos renais, aumento do glomérulo e espaço periglomerular (Figura 13C, 13D, 13G e 13H).

Figura 13 - Fotomicrografia de renal de camundongos tratados com EMMP por 30 dias.



Fotomicrografia renal de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) administrados com extrato metanólico de folhas de *M. prasina* por 30 dias, HE, 20X. Controle (A e E); EMMP 30 mg / kg (B e F); EMMP 100 mg / kg (C e G); EMMP 300 mg / kg (D e H). **DPG**: redução do espaço periglomerular; **APG**: aumento do espaço periglomerular; **HG**: aumento de glomérulos; EMMP: extrato metanólico de *Miconia prasina*.

Os rins exercem múltiplas funções que podem ser caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endócrina e metabólica. A função primordial dos rins é a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos renais e excreção de outras substâncias. Os níveis séricos de creatinina e uréia são utilizados na clínica como indicadores da função renal (SODRÉ; COSTA; LIMA, 2007). Apesar de não ter sido observado alteração nos níveis séricos creatinina e uréia, foi possível constatar na análise histopatológica alterações nos glomérulos e túbulos renais. Estes resultados indicam que a administração subcrônica do EMMP induz uma baixa toxicidade renal. Os níveis normais de creatinina sérica e uréia observados neste estudo foram consistentes com as alterações renais mínimas observadas.

O baço, o maior órgão linfóide do corpo, desempenha funções imunológicas relevantes, tais como depuração de bactérias da corrente sanguínea, produção de linfócitos e monócitos, além da síntese de fatores do sistema complemento e imunoglobulinas, principalmente IgM (TORRES et al., 2000). O baço apresentou características histológicas normais para todos os grupos testados. Não foram observadas alterações na cápsula, trabécula, polpa branca e vermelha (dados não apresentados).

6 CONCLUSÃO

- a) O perfil fitoquímico dos extratos de *M. prasina* detectaram a presença de alcaloides, antraquinonas, cumarinas, flavonoides, taninos e terpenos. Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *M. prasina* apresentaram respectivamente maior teor de cumarinas, flavonoides e fenóis totais;
- b) Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *M. prasina* apresentaram atividade antioxidante pelo método de radicais livres e poder de redução do ferro;
- c) Os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *M. prasina* na dose de 2000 mg/kg apresentaram baixa toxicidade quando administrados por via oral, pois não alteraram os parâmetros comportamentais, fisiológicos e hematológicos avaliados;
- d) Os extratos de *M. prasina* reduziram a migração de polimorfonucleares e os níveis de IL-1 β no exsudato do bolsão de ar induzido por carragenina, entretanto não reduziram os níveis de TNF- α ;
- e) Os extratos acetato de etila e metanólico de *M. prasina* reduziram a formação do edema induzido por carragenina e a permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Estes resultados sugerem que o efeito anti-inflamatório demonstrado pelos extratos podem ser atribuído à inibição da liberação de mediadores pro-inflamatórios, tais como histamina, prostaglandinas, IL-1 β e NO;
- f) O extrato metanólico de *M. prasina* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não apresentou efeito hepatoprotetor contra a toxicidade induzida pelo acetaminofeno (250 mg/kg). Os níveis séricos das enzimas alanina transaminase, aspartato transaminase e fosfatase alcalina apresentaram-se altos, e as alterações histopatológicas observadas confirmaram esses resultados;
- g) A administração subcrônica do extrato metanólico de *M. prasina* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg apresentou baixa toxicidade pois não induziu a mortalidade ou causou alterações nos parâmetros fisiológicos. No entanto, o extrato nas doses de 100 e 300 mg/kg reduziu o número de leucócitos polimorfonucleares em camundongos machos e alterações estruturais no tecido hepático e renal quando administrado oralmente durante 30 dias.

REFERÊNCIAS

AHMAD, S. F.; KHAN, B.; BANI, S.; SURI, K. A.; SATTI, N. K.; QAZI, G. N. Amelioration of adjuvant-induced arthritis by ursolic acid through altered Th1/Th2 cytokine production. **Pharmacology Research**, v.53, p. 233–240, jan. 2006.

AHMADI, A.; EBRAHIMZADEH, M.A.; AHMAD-ASHRAFI, S.; KARAMI, M.; MAHDAVI, M.R.; SARA VI, S.S.S. Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H₂ receptor antagonists. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.25, n.1, p.72–79, fev. 2011.

ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 678-689, dec. 2006.

ALMEIDA, A. C.; SOBRINHO, E. M.; PINHO, L.; SOUZA, P. N. S.; MARTINS, E. R.; DUARTE, E. R.; SANTOS, H. O.; BRANDIL, I. V.; CANGUSSU, A. S.; COSTA, J. P. R. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Ciência Rural, Santa Maria**, v. 40, n. 1, p. 200-203, nov. 2009.

AMORIM, E.L.C.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; PEIXOTO-SOBRINHO, T.J.S.; ARAÚJO, T.A.S.; ALBUQUERQUE, U.P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystem Community**, v.2, n.1, p. 88-94, out. 2008.

ASHTON, C.; GLASS, M. The cannabinoid CB₂ receptor as a target for inflammation-dependent neurodegeneration. **Current Neuropharmacology**, v. 5, n. 2, p. 73-80, 2007.

ATANASOV, A.G.; WALTENBERGER, B.; PFERSCHY-WENZIG, E.M., LINDER, T.; WAWROSCHE, C.; UHRIN, P.; TEMML, V.; WANG, L.; SCHWAIGER, S.; HEISS, E.H.; ROLLINGER, J.M.; SCHUSTER, D.; BREUSS, J.M.; BOCHKOV, V.; MIHOVILOVIC, M.D.; KOPP, B.; BAUER, R.; DIRSCH, V.M.; STUPPNER, H. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v.33, p.1582-1614, ago. 2015.

ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticoides. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. S159-S65, 2008.

ANTONINI, R. D.; NUNES-FREITAS, A. F. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Miconia prasina* D.C. (Melastomataceae) em duas áreas de Floresta Atlântica na Ilha Grande, RJ, Sudeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 18, n. 3, p. 671-676, fev. 2004.

AQUINO, F.G.; WALTER, B.M.T.; RIBEIRO, J.F. Espécies vegetais de usos múltiplo e reservas legais de cerrado –Balsas MA. **Revista Brasileira de Biociência**, v.5, n.1, p.147-149, jul. 2007.

ARFÉ, A.; SCOTTI, L.; VARS-LORENZO, C.; NICOTRA, F.; ZAMBON, A.; KOLLHORST, B.; SCHINK, T.; GARBE, E.; HERINGS, R.; STRAATMAN, H.; SCHADE, R.; VILLA, M.; LUCCHI, S.; VALKHOFF, V.; ROMIO, S.; THIESSARD, F.; SCHUEMIE, M.; PARIENTE, A.; STURKENBOOM, M.; CORRAO, G. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of heart failure in four European contries: nested case-control study. **BMJ**, v.354, i4857, p. 1-11, set. 2016.

ARHOGHRO, E.M.; EKPO, K.E.; ANOSIKE, E.O.; IBEH, G.O. Effect of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del) on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver damage in albino Wistar rat's. **European Journal of Science Research**, v.26, p.122–130, 2009.

AZAB, A.; NASSAR, AHMAD. AZAB, A. N. Anti-Inflammatory Activity of Natural Products. **Molecules**, v. 21, n.10, p. 1-19, out. 2016.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v.99, n.1, p.191- 203, jul. 2006.

BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cerebro-Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, abr. 2010.

BENZIE, I.F.F.; STRAIN, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidante power: the FRAP assay. **Analytical Biochemistry**, v.239, p. 70-76, jul. 1996.

BERGER, M.; GRAY, J.A.; ROTH, B.L. The expanded biology of serotonin. **Annual Review of Medicine**, v.60, p.355-366, fev. 2009.

BERRIN, Y.; ALI, O.; UMUT, S.; MELTEM, E.; MURAT, B.; BARUT, Y. Multi-organ toxicity following ingestion of mixed herbal preparations: An unusual but dangerous adverse effect of phytotherapy. **Europeun Journal of International Medicine**. v.17, n.2, p.130-132, mar. 2006.

BERNAYS, E.; LUPI, A.; BETTOLO, M.; MASTROFRANCESCO, C.; TAGLIATESTA, P. Antifeedant nature of the quinone primin and its quinol miconidin from *Miconia* spp. **Experientia**, v. 40, n. 9, p. 1010- 1011, set. 1984.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50, 2007.

BOSCOLO, O. H.; VALLE, L. S. Plantas de uso medicinal em Quissamã, Rio de Janeiro, Brasil. **Iheringia**, v. 63, n. 2, p. 263-277, set. 2008.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretária Nacional de Vigilância sanitária. Portaria SNVS n 19 de 30.01.92. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale L.*) em preparações para uso interno, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaftund Technologie**, v.28, p. 25–30, jun. 1995.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 7, n. 3, p. 97-106, dez. 2005.

CASTRO, M. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticoides: concordância ou discordância? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.49, n.3, p. 334-336, jun. 2005.

CARRAZONI, A.S.H.S.G.G. Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (MELASTOMATACEAE). 2016. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Pernambuco. 2016.

CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESSOTO, M. A.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34, p. 339-340, dez. 2003.

CHAGAS, E.C.O. 2012. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) na Floresta Atlântica do Nordeste Oriental. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 159p.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceeding of National Academy of Science of the United States of America**, v.99, n.21, p.13926-13931, set. 2002.

CHECKER, R.; SANDUR, S.K.; SHARMA, D.; PATWARDHAN, R.S.; JAYAKUMAR, S.; KOHLI, V.; SETHI, G.; AGGARWAL, B.B.; SAINIS, K.B. Potent anti-inflammatory activity of ursolic acid, a triterpenoid antioxidant, is mediated through suppression of NF-kB, AP-1 and NF-AT. **PLoS ONE**, v.7, n.2, p. 1-15, fev. 2012.

CHENOWETH, M.B.; HAKE, C.L. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.2, p.363–398, 1962.

CIGREMIS, Y.; TUREL, H.; ADIGUZEL, K.: The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.323, n.1-2, p. 31–38, nov. 2009.

CLELAND, J. G. Preventing atherosclerotic events with aspirin. **British Medical Journal**, v. 324, n. 7329, p. 103-105, jan. 2002.

COLE, R.L.; KONRADI, C.; DOUGLASS, J.; HYMAN S.E. Neuronal adaptation to amphetamine and dopamine: molecular mechanisms of prodynorphin gene regulation in rat striatum. **Neuron**, v.14, n.4, p.813-823, abr. 1995.

CONAGHAN, P.G. A turbulent decade for NSAIDs: update on current concepts of classification, epidemiology, comparative efficacy, and toxicity. **Rheumatology International**, v.32, n.6, p.491-502, dez. 2012.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 272-278, set. 2005.

COUTO, J.L.A.; VIEIRA, R.C.S.; BARBOSA, J.M.; MACHADO, S.S.; FERREIRA, H.S. Alterações da função hepática de camundongos desnutridos e infectados pelo *Schistosoma mansoni*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n.4, p. 390-393, ago. 2008.

CREVELIN, E. J.; TURATTI, I. C. C.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 827-830, ago. 2006.

CRIADO, P.R.; MARUTA, C.W.; CRIADO, R.F.J.; FILHO, C.A.M. Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.2, p.195-210, abr. 2010.

CRUZ, A. V M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies da família Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. **Floresta e Ambiente**, v. 11, n.1, p. 47-52, dez. 2004.

CRUVINEL, W.M.; JUNIOR, D.M.; ARAUJO, J.A.P.; CATELAN, T.T.T.; SOUZA, A.W.S.; SILVA, N.P.; ANDRADE, L.E.C. Sistema imunitário – Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v.50, n.4, p. 448-461, ago. 2010.

- CUNHA, W. R.; ANDRADE E SILVA, M. L.; TURATTI, I. C. C.; FERREIRA, D. S.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 84, n. 2, p. 47-49, fev. 2003a.
- CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. D.; CROTTI, A. F.M.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Medica**, v. 69, p. 474-478, maio 2003b.
- CUNHA, W.R.; CREVELIN, E.J.; ARANTES, G.M. et al. A study of the tripanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy. Research**, v.20, p.474-478, abr. 2006.
- CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.A.; SANTOS, F.M.; MONTENEGRO, I. M.; OLIVEIRA, A. R. A.; TAVARES, H. R.; LEME DOS SANTOS, H. S.; SILVA BIZÁRIO, J. C. *In Vitro* Inhibition of Tumor Cell Growth by *Miconia fallax*. **Pharmaceutical Biology**, v.46, n.4, p.292–294, out. 2008.
- CUNHA, W. R.; MATOS, G. X.; SOUZA, M. G. M.; TOZATTI, M. G.; ANDRADE E SILVA, M. L.; MARTINS, C. H. G.; SILVA, R.; SILVA FILHO, A. A. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 2, p. 166-169, fev. 2010.
- DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519-550, abr. 2009.
- DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. **Journal of Pathology**, v.104, p.15 – 29, maio 1971.
- EDWARDS, J.C.; SEDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of fair: an in vivo tissue culture system. **Journal of Pathology**, v.134, n.2, p. 147-156, jun. 1981.
- FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, p. 369-394, set. 2006.
- FENG, D.; LING, W. H.; DUAN, R. D. Lycopene suppresses LPS-induced NO and IL-6 production by inhibiting the activation of ERK, p38MAPK, and NF-kappaB in macrophages. **Inflammation Research**, v. 59, p.15–121, feb. 2010.

FLOEGEL, A.; KIM, D. O.; CHUNG, S. J.; KOO, S. I.; CHUN, O. K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n.7, p.1043-1048, nov. 2011.

FRANCISCHETTI, I.; MORENO, J.B.; SCHOLZ, M.; YOSHIDA, W.B. Leucócitos e a resposta inflamatória na lesão de isquemia-reperfusão. **Revista Brasileira de Circulação Cardiovascular**, v.25, n. 4, p. 575-584, out. 2010.

FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.; ALMEIDA, K.R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M.B. Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v.421, n.3, p.157-164, jun. 2001.

FRANKE, A.; LANTE, W.; FACKELDEY, V.; BECKER, H. P.; THODE, C.; KUHLMANN, W. D.; MARKEWITZ, A. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n. 2, p. 363-371, ago. 2002.

FUJIWARA, N.; KOBAYASHI, K. Macrophages in inflammation. **Current drug targets. Inflammation and allergy**, v.4, n.3, p.281-286, jun. 2005.

FULLERTON, J.N.; GILROY, D.W. Resolution of inflammation: a new therapeutic frontier. **Nature Reviews Drug Discovery**, p.1-17, ago. 2016.

GABAY, C.; LAMACCHIA, C.; PALMER, G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. **Nature Review of Rheumatology journal**, v. 6, n.4, p.232-234, abr. 2010.

GEPDIREMEN, A.; MSHVILDADZE, V.; SULEYMAN, H.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 191–195, set. 2004.

GERTSCH, J.; VIVEROS-PAREDES, J. M.; TAYLOR, P. Plant immunostimulants—Scientific paradigm or myth? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, p. 385– 391, jul. 2011.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à Bioquímica Clínica Animal**. Gráfica de Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2003. 198p.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M. S.; PINTO, D. C. G. A.; SANTOS, C. M. M.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIMA, J. L. F. C. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**, v.78, n. 2, p. 171-177, abr. 2009.

- GOLDENBER, G. R. 259p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - UNICAMP, Campinas, 2000.
- GOLDENBERG, R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; SOUZA, M. L. R. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chaves de identificação para os gêneros. **Rodriguésia**, v. 63, n. 1, p. 145-161, mar. 2012.
- GUAY, J.; BATEMAN, K.; GORDON, R.; MACINI, J.; RIENDEAU, D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. **Journal of Biology Chemistry**, v.279, p.24866–24872, mar. 2004.
- GUERRA, A.S.H.S.; MALTA, D.J.N.; LARANJEIRA, L.P.M.; MAIA, M.B.S.; COLAÇO, N.C.; LIMA, M.C.A.; GALDINO, S.L.; PITTA, I.R.; SILVA, T.G. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of índole-imidazoline derivates. **International Immunopharmacology**, v.11, n.11, p. 1816-1822, ago. 2011.
- GUO, L.; LI, J.; YE, H.; ZHENG, R.; HAO, X. J.; CHEN, W. Y.; JÜ, R.; YAO, Y.R.; YANG, H.F.; YU, X.L.; YE, C.Y. ZHANG, D.C. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. **American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.325, p. 10-16, jun. 2008.
- GUNATILAKA, A. A. L.; BERGER, J. M.; EVANS, R.; MILLER, J. S.; WISSE, J. H.; NEDDERMANN, K.M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G. I. Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive Benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 64, n. 1, p. 2-5, jan. 2001.
- GUZIK, T.J.; KORBUT, R.; ADAMEK-GUZIK, T. Nitric oxide and superoxide in inflammation and imune regulation. **Journal of Physiology and Pharmacology: an official journal of Polish physiological society**, v.54, n.4, p. 469-487, dez. 2003.
- HARBONE, J.B.; MABRY, T.J.; MABRY, H. **The flavonoids**. London: Chapman and Hall. 1975.
- HAEGGSTROM, J.Z.; FUNK, C.D. Lipoxigenase and Leukotriene Pathways: Biochemistry, Biology, and Roles in Disease. **Chemical Reviews**, v.111, n.10, pp.5866–5898, set. 2011.
- HAMMER, K.D.; HILLWIG, M.L.; SOLCO, A.K.; DIXON, P.M.; DELATE, K.; MURPHY, P.A.; WURTELE, E.S.; BIRT, D.F. Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory *Hypericum perforatum* extracts and constituents in RAW 264.7 mouse macrophage cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 7323–7331, ago. 2007.

HASRAT, J. A.; BACKER, J. P.; VAUQUELIN, G.; VLIETINCK, A. J. Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptorbinding activity. **Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 59-65, mar. 1997.

HILÁRIO, M.O.E.; TERRERI, M.T.; LEN, C.A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, p. 206-212, nov. 2006.

HIKINO, H.; KISO, Y. **Natural Products for Liver Disease**. London: Academic Press. p.39–42, 1988.

HORN, T.; ADEL, S.; SCHUMANN, R.; SUR, S.; KAKULARAM, K.R.; POLAMARASETTY, A.; REDANNA, P.; KUHN, H.; HEYDECK, D. Evolutionary aspects of lipoxygenases and genetic diversity of human leukotriene signaling. **Progress in Lipid Research**, v.57, p.13–39, nov. 2015.

HWANG, S.H.; WECKSLER, A.T.; WAGNER, K.; HAMMOCK, B.D. Rationally designed multitarget agente against inflammation and pain. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n.13, p. 1783-1799, 2013.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.25, p. 2868-2885, 2007.

JAESCHKE, H.; MITCHELL, J.R. Neutrophil accumulation exacerbates acetaminophen induced liver injury, **The FASEB Journal**, v.3, p.articleA920, 1989.

KAPOOR, S.; FITZPATRICK, M.; CLAY, E.; BAYLEY, R.; WALLACE, G.R.; YOUNG, S.P. Metabolomics in the analysis of inflammatory diseases. **Intechopen**, v.11, p. 269-288, fev. 2012.

KANG, S. Y.; YOON, S. Y.; ROH, D. H.; JEON, M. J.; SEO, H. S.; UH, D. K.; KWON, Y. B.; KIM, H. W.; HAN, H. J.; LEE, H. J.; LEE, J. H. The antiarthritic effect of ursolic acid on zymosan-induced acute inflammation and adjuvant-induced chronic arthritis models. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p.1347–1354, out. 2008.

KELLEHER, Z.T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J.S.; MARSHALL, H.E. NOS2 regulation of NF-kappa B by S-nitrosylation of p65*. **Journal of Biological Chemistry**, v.282, n. 42, p. 30667-30672, ago. 2007.

KOH T. J., DIPIETRO L. A. Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v.13, e23, p. 1-12, jun. 2012.

KOVACOVA-HANUSKOVA, E.; BUDAY, T.; GAVLIAKOVA, S.; PLEVKOVA, J. Histamine, histamine intoxication and intolerance. **Allergologia et immunopathologia**, v.43, n.5, p.498-506, ago. 2015.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Patologia Básica**. 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013. 928 p.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research Therapy**, v.10, (Suppl 2), S4, out. 2008.

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

LASKIN, D.L.; PILARO, A.M. Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v.86, n.2, p.204–215, nov. 1986.

LEITE, T. C. C. Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero *Miconia* (Melastomataceae). 2016. Tese (Doutorado em Inovação Terapêutica) -Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2016.

LIMA-SARAIVA, R. G. Efeito antinociceptivo de espécies de Bromeliaceae nativas da caatinga: um estudo comparativo. 2012. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2012.

LIAO, K.L.; YIN, M.C. Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidyl choline liposome systems: Importance of the partition coefficient. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.48, p.2266–2270, jun. 2000.

LI, X.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELSOHLY, H. N.; NIMROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* aspartic proteases. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 1282-1285, out. 2001.

LIU, J. Oleanolic acid and ursolic acid: Research perspectives. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 92–94, ago. 2005.

LU, J.; WU, D. M.; ZHENG, Y. L.; HU, B.; CHENG, W.; ZHANG, Z. F.; SHAN, Q. Ursolic acid improves high fat diet-induced cognitive impairments by blocking endoplasmic reticulum stress and I κ B kinase beta/nuclear factor- κ B-mediated inflammatory pathways in mice. **Brain, Behavior and Immunity**, v. 25, p. 658–67, nov. 2011.

LUCIO, E.M.R.A.; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e creening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Revista Brasileira de Farmacognosia**; v.9, n.10, p.23-25, 2000.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* triana através de análise por microcomputador. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MCCORD, J.M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **American Journal of medicinal Science**, v.108, p.652–659, jun. 2000.

MCINNES, I.B.; SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England journal of Medicine**, v.365, n.23, p. 2205-2219, dez. 2011.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. S. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no Município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botanica Brasileira**, v. 21, n. 2, p. 263-275, set. 2007.

MAIONE, F.; RUSSO, R.; KHAN, H.; MASCOLO, N. Medicinal plants with anti-inflammatory activities. **Natural Product Research**, v. 30, n.12, p.1343-1352, jul. 2016.

MALONE, M.H.; ROBICHAUD, R.C.A. hippocratic screening for pure or drug materials. **Lloydia**. v. 25, p. 23-53, 1962.

MANCINI, E.; MARTINO, L.; BELISARIO, M. A.; FEO, V. Flavonoids of *Miconia alypifolia* and their antioxidant activity. **Pharmacology online**, v. 2, p. 452-460, jan. 2008.

MAMAT, S. S.; KAMAROLZAMAN, M. F. F.; YAHYA, F.; MAHMOOD, N. D.; SHAHRIL, S. S.; JAKIUS, K. F.; MOHTARRUDIN, N.; CHING, S. M.; SUSANTI, D.; TAHER, M.; ZAKARIA, Z. A. Methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves exerted antioxidant and liver protective activity in rats. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 1-12, nov. 2013.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; CANTONI, O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 1940-1944, 2007.

MASKREY, B. H.; MEGSON, I. L.; WHITFIELD, P. D.; ROSSI, A. G. Mechanisms of resolution of inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v. 31, p. 1001-1006, maio 2011.

MARTINEZ, J. H. I.; CASTIBLANCO, L. A. V.; ARISTIZABAL, L. S. R.; CALLE, L. M.; JIMENEZ, F. J.; RAMIREZ, J.; GÓMEZ, L. C. Actividad ictiotóxica de *Miconia coronata* (BONPL.) D.C. (Melastomataceae). **Scientia et Technica Año XI**, p. 197-201, out. 2005.

MARTINEZ, J. H. I.; TAPIAS, J.; LÓPEZ, J.; MARÍN, D.; OROZCO, L. M.; RIVERA, D. A.; CASTIBLANCO, L. A. V.; ARISTIZABAL, L. S. R. Nuevo flavonoide glicosilado de *Miconia coronata* (BONPL.) y actividad antibacterial. **Scientia et Technica año XIII**, v. 1, n. 33, p.311, 2007.

MELO, F. B. Estudo dos efeitos de Lantana camara (Verbenaceae) sobre a fertilidade e reprodução de ratos. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Escola de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2001. 120p.

MOSQUERA, O. M.; CORRERA, Y. M.; NIÑO, J. Antioxidant activity of plants from Colombian flora. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2A, p. 382-387, jun. 2009.

MOURA, H.V.; POMERANTZEFF, P.M.A.; GOMES, W.J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. **Revista brasileira de Circulação Cardiovascular**, v.16, n.4, p. 376-387, 2001.

MORRIS, C.J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v.225, p.115-121, 2003.

MUNARI, C. C.; ALVES, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 22-28, jan. 2010.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta fisiatrica**, v.16, n.4, p.186-190, jun. 2009.

NICOLETTI, M.A.; OLIVEIRA-JUNIOR, M.A.; BERTASSO, C.C.; CAPOROSSI, P.Y.; TAVARES, A.P.L. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v.19, n. 1/2, p. 32-40, 2007.

OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, 2001. 14p.

OKAMOTO, T.; GOHIL, K.; FINKELSTEIN, E.I.; BOVE, P.; AKAIKE, T.; VAN DER VLIET, A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. *American Journal of Physiology*. **Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, n.1, p. 198-209, jan. 2004.

OLIVEIRA, A.C.B.; OLIVEIRA, A.P.; GUIMARÃES, A.L.; OLIVEIRA, R.A.; SILVA, F.S.; REIS, S.A.G.B.; RIBEIRO, L.A.A.; ALMEIDA, J.R.G.S. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.2, p.244-249, nov. 2013.

OSÓRIO, A.C.; MARTINS, J.L.S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco pro espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v.40, n.4, p. 481-486, dez. 2004.

PAGOLA, S.; TRACANNA, M. I.; AMANI, S. M.; GONZALEZ, A. M.; RASCHI, A. B.; ROMANO, E.; BENAVENTE, A. M.; STEPHENS, P. W. Sideroxylin from *Miconia ioneura*: Monohydrate Crystal structure from high resolution x-ray poder diffraction. **Natural products communication**, v. 3, n. 5, p. 759-764, abr. 2008.

PAPAVERO, N.; TEIXEIRA, D. M.; CAVALCANTE, P. B.; HIGUCHI, H. **Landi: fauna e flora da Amazônia brasileira**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2002. 260 p.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p.937-944, fev. 2001.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacological Research**, v. 59, n.5, p. 285-289, fev. 2009.

PATRIGNANI, P.; PATRONO, C. Cyclooxygenase inhibitors: From pharmacology to clinical read-outs. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1851, n.4, p.422-432, set. 2015.

PEIXOTO, A. L.; ROSA, M. M. T.; SILVA, I. M. Caracterização da Mata Atlântica. In: SYLVESTRE L.S.; ROSA, M.M.T. (Eds.). 2002. **Manual metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica**. pp. 9-23.

PEIXOTO, J. A.; SILVA, M. L. A.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; JANUÁRIO, A. H.; GROppo, M.; MAGALHÃES, M. G.; SANTOS, F. F.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R. Antileishmanial activity of hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 1825-1833, fev. 2011.

PEIXOTO SOBRINHO, T.J.S.; SILVA, C.H.T.P.; NASCIMENTO, J.E.; MONTEIRO, J.M.; ALBUQUERQUE, U.P.; AMORIM, E.L.C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.44, n.4, p. 683-9, 2008.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. **Microcirculation**, v. 7, n. 3, p. 147-61, 2000.

PEREIRA-LEITE, C.; NUNES, C.; JAMAL, S.K.; CUCCOVIA, I.M.; REIS, S. Nonsteroidal anti-inflammatory therapy: A journey toward safety. **Medicinal Research Reviews**, v. 00, n.0, p.1-58, dez. 2016.

PIERONI, L.G.; REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. **Molecules**, v.16, p.9439-9450, nov. 2011.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-815, fev. 2007.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, n. 2, p. 337-341, maio 1999.

PYRZYNSKA, K.; BIESAGA, M. Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey. **Trends Analytical Chemistry**, v.28, n.7, p.893- 902, ago. 2009.

QUEIROZ, G. M.; SOUZA, M. G. M.; CARVALHO, T. C.; CASEMIRO, L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Absence of the antibacterial activity of the crude extracts and compounds isolated from *M. rubiginosa* against extended-spectrum B-lactamase producing enterobacteria. **Journal of Pharmaceutical Negative Results**, v. 2, n. 1, p. 1-7, 2011.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology Medicine**, v.26, n.9-10, p. 1231-1237, maio 1999.

REFLORA. *Miconia* in **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB9750>>. Acesso em: 03 Fev. 2017

REZENDE, A. R.; ROMERO, R.; GOLDENBERG, R. Sinopse de *Miconia* Seção *Miconia* DC. (Melastomataceae) no estado de Minas Gerais, Brasil. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 273-287, abr. 2014.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids – new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-1723, out. 2005.

RIBBONS, K.A.; CURRIE, M.G.; CONNOR, J.R.; MANNING, P.T.; ALLEN, P. C.; DIDIER, P.; RATTERREE, M.S.; CLARCK, D.A.; MILLER, M.J.S. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.280, n.2, p.1008-1015, fev. 1997.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and pharmacobiothecnology**. Baltimore: Willians & Wilkins, 1996. P. 1-14.

ROCHA, A.O.B.; PITA, J.C.L.R.; OLIVEIRA, K.M.; MOTA, C.A.X.; ESTEVAM, E.C.; VIANA, W.P.; SÁ, R.C.S.; DINIZ, M.F.F.M. Efeito toxicológico do extrato hidroalcoólico de *Pradosia huberi* Ducke em ratos Wistar. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.93, n.3, p.371-378, jul. 2012.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, n. 1, p. 120-126, mar. 2008.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L.C.; VILEGAS, W. Na unusual C6–C6 linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v.68, p.1781–1784, maio 2007.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande- Minas Gerais. **Ciências Agrotecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 102-123, fev. 2001.

RONDON NETO, R. M.; SANTOS, J. S.; SILVA, M. A.; KOPPE, V. C. Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. **Revistas científicas de américa latina y el caribe, españa y Portugal**, v.10, n.2, p. 113-126, 2010.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO, S.; ECHTENACHER, B.; DI SANTO, E. Carrageenan-induced acute inflammation in the air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor. **Mediators of inflammation**, v. 6, p. 32-38, 1997.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.Q.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, D.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, jun. 1996.

SCORTICATI, C.; PRESTIFILIPPO, J.P.; EIZAYAGA, F.X.; CASTRO, J.L.; ROMA, Y. S.; FERNÁNDEZ, M.A.; LEMBERG, A.; PERAZZO, J.C. Hyperammonemia: brain oedema and blood-brain barrier alterations in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication. **World Journal of Gastroenterology**, v.10, p.1321–1324, maio 2004.

SCHAICH, K. M.; TIAN, X.; XIE, J. Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays. **Journal of Functional Foods**, v. 14, p.111-125, abr. 2015.

SCHINONI, M. I. Fisiologia hepática. **Gazeta Médica da Bahia**, v.76, n.1, p.S5-S9, 2006.

SERNA, D. M. O.; MARTÍNEZ, J. H. I. Phenolics and Polyphenolics from Melastomataceae species. **Molecules**, v. 20, p. 17818-17847, set. 2015.

SERHAN, C.N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature reviews immunology**, v.8, p. 349-361, maio 2008.

SERPELONI, J. M.; BARCELOS, G. R. M.; MORI, M. P.; YANAGUI, K.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an *in vitro* analysis. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v.63, n.5, p.499-504, jul. 2011.

SERPELONI, J. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. Avaliação *in vivo* da anticlastogenicidade de extratos de plantas medicinais do gênero *Miconia* através do teste de micronúcleo. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n.1, p. 47-56, jun. 2008.

SEDDGWICK, A.D.; LEES, P.A. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. **Agents Actions**, v.18, n.3-4, p.439-436, jun. 1986.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K. HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceeding of the National Academy of Science of the U.S.A.** v.91, p.12013-12017, dez. 1994.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SIN, Y.M.; SEDDGWICK, A.D.; WILLOUGHBY, D.A. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six-day air pouch model in the mouse. **Annls of the Rheumatic disease**, v.45, p. 873-877, out. 1986.

SIMS, J. E.; SMITH, D.E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature Reviews Immunology**, v.10, p. 89-102, jan. 2010.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4, p.618-26, dez. 2008.

SILVA, M. L. A., CUNHA, W.R.; PEDRO, C.; GARCIA, P. A.; MARTINS, C. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extract of *Miconia fallax*. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 142, n. 2, p. 158-160, abr. 2002.

SIQUEIRA - JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. 238 p.

SLATER, D.; KUNNATHIL, S.; MCBRIDE, J.; KOPPALA, R. Pharmacology of nonsteroidal antiinflammatory drugs and opioids. **Seminars in international radiology**, v. 27, n. 4, p. 400-411, dez. 2010.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606-609, nov. 2003.

SMITH, W.L.; URADE, Y.; JAKOBSSON, P.J. Enzymes of the Cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. **Chemical Review**, v.111, n.10, p. 5821-5865, out. 2011.

SODRÉ, F. L.; COSTA, J.C. B.; LIMA, J. C. C. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.43, n.5, p.329-337, out. 2007.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C.J.; ARROYO, M.T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. Best practice and research. **Clinical gastroenterology**, v.24, n.2, p.121-132, abr. 2010.

STALCUP, M. M. Plantas de uso medicinal ou ritual numa feira livre no Rio de Janeiro, Brasil. 2000. 202 pp. Dissertação (Ciências biológicas – botânica). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

STARR, S.; HAND, H. Nursing care of chronic and acute liver failure. **Nursing Standard**, v.16, p.47-54, 2002.

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Nutrition Society: Public Health Nutrition**, v. 3, n.4A, p. 501-508, dez. 2000.

SULAIMAN, M. R.; SOMCHIT, M. N.; ISRAF, D. A.; AHMAD, Z.; MOIN, S. Antinociceptive effect of *Melastoma malabathricum* ethanolic extract in mice. **Fitoterapia**, v.75, p. 667-672, dez. 2004.

SUH, N., HONDA, T., FINLAY, H.J., BARCHOWSKY, A., WILLIAMS, C., BENOIT, N.E., XIE, Q.W., NATHAN, C., GRIBBLE, G.W., SPORN, M.B. Novel triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. **Cancer Research**, v. 58, p. 717–723, fev. 1998.

TARAWNEH, A. H.; LEÓN, F.; IBRAHIM, M. A.; PETTAWAY, S.; MCCURDY, C. R.; CUTLER, S. J. Flavanones from *Miconia prasina*. **Phytochemistry letters**, v. 7, p. 130-132, fev. 2014.

TESLIM, O. A.; VYVIENNE, M.; OLATOKUNBO, O. M.; OLUWAFISAYO, A. J.; MLENZANA, N. B.; SHAMILA, M.; NESTO, T.; GRACE, M. Side effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs: The experience of patients with musculoskeletal disorders. **American Journal of Health Research**, v. 2, n.4, p. 106-112, 2014.

TÔRRES, A.R.; OLIVEIRA, R.A.G.; DINIZ, M.F.F.M.; ARAÚJO, E.C. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.373-80, ago. 2005.

TORRES, O.J.M.; MACEDO, E.L.; PICCIANI, E.R.G.; NUNES, P.M.S.; COSTA, J. V. G.; CARVALHO, A. B.; JUNIOR, P. S. L. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos à esplenectomia subtotal. **Acta Cirurgica Brasileira**, v.15, p.1-12, 2000.

TSUCHIYA, M.; SATO, E.F.; INOUE, M.; ASADA, A. Acupuncture enhances generation of nitric oxide and increases local circulation. **Anesthesia and analgesia**, v.104, n.2, p. 301-307, fev. 2007.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de algumas fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, n.2, p. 289-306, jun. 2006.

UMAR, M.I.; ASMAWI, M.Z.; SADIKUN, A.; ABDUL MAJID, A.M.S.; ATANGWHO, I.J.; AHAMED, M.B.K.; ALTAF, R.; AHMAD, A. Multi-constituent synergism is responsible for anti-inflammatory effect of *Azadirachta indica* leaf extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, p. 1411–1422, jul. 2014.

VALADARES, M.C. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p. 93-8, 2006.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.C.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antinociceptive Effects of Interleukin-4, -10, and -13 on the Writhing Response in Mice and Zymosan-Induced Knee Joint Incapacitation in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 102-108, jun. 2003.

VASCONCELOS, M.A.L.; FERREIRA, M.L.D.S.; ANDRADE E SILVA, R. et al. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans*. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.142, p.333-335, out. 2003.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. A.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C.T.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z. Naturforsch**, v. 6, p. 477-482, 2006.

VEIGA-JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na região centro-norte do estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n. 2, p. 308-313, jun. 2008.

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

VENDRAMINI-COSTA, D. B.; CARVALHO, J. E. Molecular link mechanisms between inflammation and câncer. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, p. 3831-3852, 2012.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, abr. 2006.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.166, p. 96 -103, mar. 1969.

VOGADO, L. H. S.; VERAS, R. M. S.; LINS, J. O. Avaliação de técnicas de segmentação para leucócitos em imagens de sangue. **Revista de Sistema de Computação**, v.6, n.1, p. 65-73, jun. 2016.

YAMAGUCHI, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURAIISHI, Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT₂ receptors in mice. **Neuroscience Research**, v.35, p.77-83, nov. 1999.

YESILADA, E.; TANAKA, S.; SEZIK, E.; TABATA, M. Phytochemical analysis and allelopathic activity of oils of *Ecballium elaterium* A. Richard growing in Iran. **Journal of Natural Products**, v.51, p. 504-508, nov. 1988.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B4: metabolism and signal transduction. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 385, n. 2, p.321-241, jan. 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. New York: Springer, 2001.

WANG, Y. J.; LU, J.; WU, D. M.; ZHENG, Z. H.; ZHENG, Y. L.; WANG, X. H.; RUAN, J.; SUN, X.; SHAN, Q, ZHANG, Z. F. Ursolic acid attenuates lipopolysaccharide-induced cognitive deficits in mouse brain through suppressing p38/NF-kappaB mediated inflammatory pathways. **Neurobiology of Learning and Memory**, v. 96, p. 156–65, set. 2011.

WINTER, C.A.; RISLEY, E.Q.; NUSS, G.W. Carageenan-induced edema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceeding of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 1, p.547-554, 1962.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v. 2, p. 251-286, set. 2015.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British journal of pharmacology chemotherapy**, v.22, p. 246-53, abr. 1964.

ZATTA, D.T.; PIMENTA, F.C.; TRESVENZOL, L.M.F.; FIUZA, T.S.; BARA, M.T.F.; CUNHA, L.C.; PUCCI, L.L.; GARROTE, C.F.D.; OLIVEIRA, F.N.M.; PAULA, J.R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. **Latin American Journal of Pharmacology**, v.28, n.4, p.485-9, 2009.

ZHANG, Z; et al. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 39-41, jan. 2003.

ZHOU, Y.; BOUDREAU, D.M.; FREEDMAN, A.N. Trends in the use of aspirin and nonsteroidal anti-inflammatory drugs in the general U.S. population. **Pharmacoepidemiology and Drug Safety**, v.23, n.1, p. 43-50, jan. 2014.

APÊNDICE A – MANUSCRITO 1
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DOS EXTRATOS DAS FOLHAS DE *Miconia*
***prasina* (Sw.) DC (MELASTOMATACEAE)**

Tatiane Bezerra de Oliveira¹, Aline Stamford H. S. G. Carrazzoni¹, Tonny Cley Campos Leite¹, Carlson Helder Reis de Carvalho Júnior¹, Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Rua prof. Arthur Sá, 1235, Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil.

*Autor correspondente: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil.

Tel.: +55 81 21268347; fax: +55 81 21268346.

E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br/teresinha.ufpe@gmail.com

RESUMO

Objetivos: as espécies de *Miconia* são uma fonte rica de compostos bioativos, mas apenas uma pequena fração dessas plantas teve suas atividades farmacológicas investigadas. Este estudo teve como objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória dos extractos de hexano (EHMP), acetato de etila (EAMP) e metanol (EMMP) das folhas de *Miconia prasina* (Sw.) DC.

Metodologia: A toxicidade aguda foi realizada com os extratos EHMP, EAMP e EMMP na dose de 2000 mg/kg. O modelo de bolsão de ar induzido por carragenina foi utilizado como triagem para selecionar o extrato com a maior atividade anti-inflamatória. Os níveis de TNF- α e IL-1 β foram medidos a partir do sobrenadante do exsudato do bolsão de ar. A atividade anti-inflamatória de EAMP e EMMP também foi avaliada pelo modelo de edema de pata induzido por carragenina e o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético.

Resultados: Os extratos não apresentaram sinais de toxicidade na dose de 2000 mg/kg. EHMP, EAMP e EMMP (30, 100 e 300 mg/kg) inibiram a migração de leucócitos para o bolsão de ar e diminuíram o nível de IL-1 β no local da inflamação, contudo não alteraram o nível de TNF- α . EAMP e EMMP também reduziram o volume de edema induzido pela carragenina e inibiram o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético, semelhante à indometacina.

Conclusão: Esses resultados sugerem que o EAMP e o EMMP inibem a liberação de mediadores pró-inflamatórios, como aminas vasoativas, citocinas (IL-1 β), prostaglandinas e óxido nítrico. O presente estudo demonstrou o potencial anti-inflamatório dos extratos hexano, acetato de etila e metanólico das folhas de *M. prasina*.

Palavra-chave: Melastomataceae, mandapuça-branco, inflamação, citocinas, toxicidade aguda.

Este artigo será submetido ao periódico **British Journal of Pharmaceutical Research**.

1. INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após o dano tecidual causado por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), produtos químicos (toxinas, substâncias cáusticas) e reações imunológicas [1, 2]. A reação inflamatória aguda é caracterizada por uma série de eventos inter-relacionados, incluindo aumento do fluxo sanguíneo e permeabilidade vascular na região afetada, exsudação de fluidos (edema), dor localizada, migração e acúmulo de leucócitos inflamatórios, formação de tecido de granulação e reparo tecidual [3]. As respostas de defesa como a inflamação, são geralmente benéficas para o corpo, agindo para limitar a sobrevivência e proliferação de patógenos invasores, promover o reparo e recuperação de tecidos. No entanto, a inflamação prolongada ou desregulada pode levar ao desenvolvimento de doenças como esclerose múltipla, artrite reumatóide, lúpus eritematoso sistêmico e doença inflamatória do intestino [4]. Os anti-inflamatórios são a abordagem terapêutica utilizada para controlar o processo inflamatório. Contudo, estas drogas têm efeitos colaterais graves, como intolerância gástrica, toxicidade renal e aumento da incidência de doenças cardiovasculares, que representam um grande obstáculo na terapia [5, 6].

A família Melastomataceae é composta por 4.500 espécies distribuídas em 150 gêneros [7], a maioria dos quais são encontrados em regiões tropicais e subtropicais do globo. O gênero *Miconia* é um dos maiores da família Melastomataceae e algumas espécies são comumente usadas na medicina popular brasileira como antirreumática, para tratar resfriados e febre [8], infecções e como cicatrizante [9]. Vasconcelos et al. [10] demonstraram os efeitos analgésicos dos extratos hexânico e diclorometano de *M. albicans*. Posteriormente, os triterpenos ácidos ursólico e oleanólico isolados do extrato de diclorometano de *M. albicans* apresentaram atividade anti-inflamatória e analgésica [11]. Outras atividades biológicas foram comprovada para as espécies do gênero *Miconia* e seus compostos isolados, como antimutagênico [12], antitumoral [13], antimicrobiano [14] e antioxidante [15, 16]. Os estudos fitoquímicos de espécies de *Miconia* revelaram a presença de triterpenos [17], flavanonas [18, 19] e benzoquinonas [20]. A análise fitoquímica do extrato metanólico de *Miconia cabucu* revelou a presença de flavonóides glicosídeos (quercetina, miricetina e kaemferol), taninos (ácido gálico) e bioflavonóides [21,22].

M. prasina é uma planta de porte arbustivo a pequena árvore, popularmente conhecida como mandapuça-branca, apaga-brasa e sabiazeira [23]. Pouco se sabe sobre a composição química e as propriedades farmacológicas desta planta. Tarawneh et al. [24] demonstraram que três flavanonas isoladas do caule de *M. prasina* exibiram baixa afinidade de ligação ao receptor canabinoide CB2. Desta forma a realização de estudos farmacológicos e toxicológicos dos extratos das folhas de *Miconia prasina* contribuirão para a descoberta de novos compostos para o desenvolvimento de

fármacos. Portanto, este estudo tem como objetivo avaliar o potencial anti-inflamatório de extratos obtidos de *Miconia prasina*.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Substâncias

HEMSTAB EDTA foi obtido do Labtest Diagnóstica (São Paulo, Brasil), ácido acético glacial foi obtido da VETEC (São Paulo, Brasil), carragenina, Azul de Evans e indometacina foram obtidos da Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA). Os kits de ELISA Mouse TNF- α e Mouse IL-1 β foram obtidos da eBioscience, (San Diego, EUA).

2.2 Material botânico

As folhas de *Miconia prasina* (Sw.) DC. foram coletadas em Rio Largo, Alagoas, Brasil. A planta foi identificada pelo botânico Earl Celestino de Oliveira Chagas do Instituto do Meio Ambiente de Alagoas (IMA-AL) e uma exsicata foi depositada no herbário do IMA-AL (N^o 50398).

2.3 Obtenção dos extratos

O pó seco das folhas de *M. prasina* (300 g) foi extraído por maceração à temperatura ambiente com hexano por sete dias. O extrato foi filtrado e o resíduo foi submetido a extração com acetato de etila durante sete dias. Novamente, o extrato foi filtrado e o resíduo foi macerado com metanol pelo período de sete dias. Os filtrados foram rotaevaporados sob pressão reduzida para se obter o extrato de hexânico (EHMP), extrato de acetato de etila (EAMP) e extrato metanólico (EMMP).

2.4 Prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada

Para análise, 5 mg dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram dissolvidos em 1 mL de seus respectivos solventes para se obter a concentração final de 5 mg/mL. Como fase fixa foram utilizadas placas de sílica gel F₂₅₄ e como fases móveis foram utilizados os sistemas eluentes para cada classe de metabólitos. Os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e pulverizadas com reveladores específicos para visualizar os compostos [25].

2.5 Animais

Foram utilizados camundongos albinos swiss machos e fêmeas *Mus musculus* (25-30 g) e *Rattus norvegicus* machos (190-200 g) provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 \pm 2 °C e umidade (50-60 %), com ciclo claro e escuro de 12 horas, recebendo ração

balanceada e água *ad libitum*. Os animais foram mantidos em jejum 8 horas antes do início de cada experimento. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (N° 23076.030375/2014-20).

2.6 Toxicidade aguda

A metodologia adotada foi realizada de acordo com a Organization for Economic Cooperation and Development [26]. Grupos de três camundongos fêmeas receberam por via oral EHMP (5% de tween 80 em solução salina a 0,9%), EAMP (5% de tween 80 em solução salina a 0,9%) e EMMP (solução salina a 0,9%) na dose de 2000 mg/kg. O controle que recebeu solução salina com 5% de tween 80 (0,1 mL/10 g). Após a administração, os ratos foram observados durante 2 h contínuas e nos 14 dias seguintes para a ocorrência de alterações comportamentais ou fisiológicas. Através do método de *screening* hipocrático observou-se o estado de consciência, humor, atividade e coordenação do sistema motor, atividade do sistema nervoso central e autônomo [27]. O ganho de peso, o consumo de água e ração foram registrados diariamente. No último dia de observação, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂ e os órgãos (fígado, rim e baço) foram dissecados, pesados e analisados quanto a alterações macroscópicas. Este procedimento foi realizado em duplicado.

2.7 Bolsão de ar induzido por carragenina em camundongos 1%

A bolsa de ar foi formada pela injeção subcutânea de 2,5 mL de ar estéril na região dorsal dos camundongos no dia 0, uma segunda injeção de ar estéril (2,5 mL) foi aplicada três dias depois. No sexto dia, camundongos machos (n=5) receberam por via oral EHMP, EAMP e EMMP nas doses de 30, 100, e 300 mg/kg; indometacina (10 mg / kg) ou veículo. Uma hora após o tratamento, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL da solução de carragenina a 1% (Sigma, EUA) na cavidade do bolsão de ar. Após 6 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, as bolsas foram lavadas com 3 mL de solução tampão fosfato contendo 3 µMol de EDTA. A contagem de leucócitos polimorfunucleares foi realizada em contador hematológico ABX Micros 60 (HORIBA, Kyoto, Japão) [28]. O extrato com melhor resultado nesse experimento foi escolhido para realização dos experimentos anti-inflamatórios.

2.8 Quantificação dos níveis de interleucina-1 β (IL-1β) e fator de necrose tumoral α (TNF-α)

Os exsudatos coletados do bolsão de ar foram centrifugados por 10 minutos a 3000 rpm, os sobrenadantes foram armazenados a -20°C para a determinação dos níveis de citocinas. A quantificação dos níveis de TNF-α e IL-1β foi realizada pela técnica de ELISA sandwich usando kits específicos para camundongos de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, California, USA). O limite de menor detecção deste ensaio foi de 10 pg/mL.

2.9 Edema de pata em ratos induzido por carragenina 1%

Ratos machos (n=5) foram tratados por via oral com EAMP e EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) ou veículo 1 h antes da injeção da carragenina. O edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% na região subplantar da pata posterior direita [29]. O volume da pata foi medido nos intervalos de 0, 1, 2, 3 e 4 h após a injeção de carragenina utilizando um pletismômetro (Ugo Basile, Itália). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi).

2.10 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1%

O aumento do ensaio de permeabilidade vascular foi realizado utilizando a técnica previamente descrita por Whittle [30] com pequenas modificações por Yesilada et al. [31]. Camundongos machos (n=5) foram tratados por via oral com EAMP e EMMP nas doses de 30, 100, e 300 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. Os animais foram anestesiados por via intraperitoneal com 0,3 mL de uma solução associada de cetamina a 10% e xilazina a 2% na proporção de 2:1. Imediatamente, os animais receberam 0,2 mL de azul de Evans 1% no plexo-orbital (Sigma, St. Louis, Missouri, EUA). Uma hora após a o tratamento oral, 0,5 mL de ácido acético a 1% foi injetado por via intraperitoneal. Após trinta minutos, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂. A cavidade intraperitoneal foi lavada com 2 mL de solução salina (0,9% NaCl). O exsudato foi centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi distribuído em triplicata em placa de 96 poços. A absorbância das amostras foram medidas a 630 nm em leitor de placas e a concentração de azul de Evans foi calculada usando uma curva padrão deste corante.

2.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – uma via), seguida pelo teste de Bonferroni, exceto o modelo de edema de pata que foi avaliado através de ANOVA - duas vias. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 e ****p < 0,0001. As análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

3. RESULTADOS

3.1 Perfil fitoquímico por cromatografia em camada delgada.

As análises cromatográficas dos extratos de *M. prasina* revelaram a presença de cumarinas, terpenos e taninos em todos os extratos, e a ausência de saponinas. Antraquinona e flavonoides foram detectados em EAMP e EMMP. Alcaloide foram detectados apenas em EMMP.

3.2 Efeito toxicológicos agudo da administração dos extratos de *M. prasina*

A administração dos extratos de *Miconia prasina* na dose de 2000 mg/kg não causou sinais de toxicidade. Não houve a ocorrência de morte durante o experimento, nem mudanças nos parâmetros fisiológicos observados (ganho de peso, consumo de água e ração). Os órgãos, fígado, rim e baço não mostraram alterações macroscopicamente. Nenhum dos extratos alterou os parâmetros hematológicos após 15 dias de administração (dados não apresentados).

3.3 Determinação da migração de polimorfonucleares e níveis de TNF- α e IL-1 β na cavidade do bolsão de ar induzido por carragenina em camundongos 1%

O pré-tratamento com EHMP, EAMP e EMMP reduziu a migração celular para a cavidade do bolsão de ar (Tabela 1). Entre os três extratos, o EMMP obteve a maior inibição na dose de 300 mg/kg (74%). A indometacina inibiu a migração celular em 84%. Os grupos tratados com os extratos de *M. prasina* não reduziram os níveis de TNF- α no exsudado inflamatório do bolsão, porém reduziram os níveis de IL-1 β (Figura 1). O mesmo foi observado para indometacina que reduziu os níveis de IL-1 β .

Tabela 1 – Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre a migração celular em bolsão de ar.

Grupo	Dose (mg/kg)	Migração Celular ($10^3 / \text{mm}^3$)	Inibição (%)
Controle	-	17,7 \pm 1,07	-
EHMP	30	9,42 \pm 0,90 ****	47
	100	7,12 \pm 0,64 ****	60
	300	6,52 \pm 0,64 ****	63
EAMP	30	8,02 \pm 0,49 ****	55
	100	6,54 \pm 0,34 ****	63
	300	5,44 \pm 0,59 ****	69
EMMP	30	9,16 \pm 0,67 ****	48
	100	6,57 \pm 0,69 ****	63
	300	4,66 \pm 0,30 ****	74
Indometacina	10	2,88 \pm 0,54 ****	84

Valores expressos em média \pm DP. (N = 5). **** $p < 0,0001$ Vs Controle. ANOVA uma via, teste de Bonferroni. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

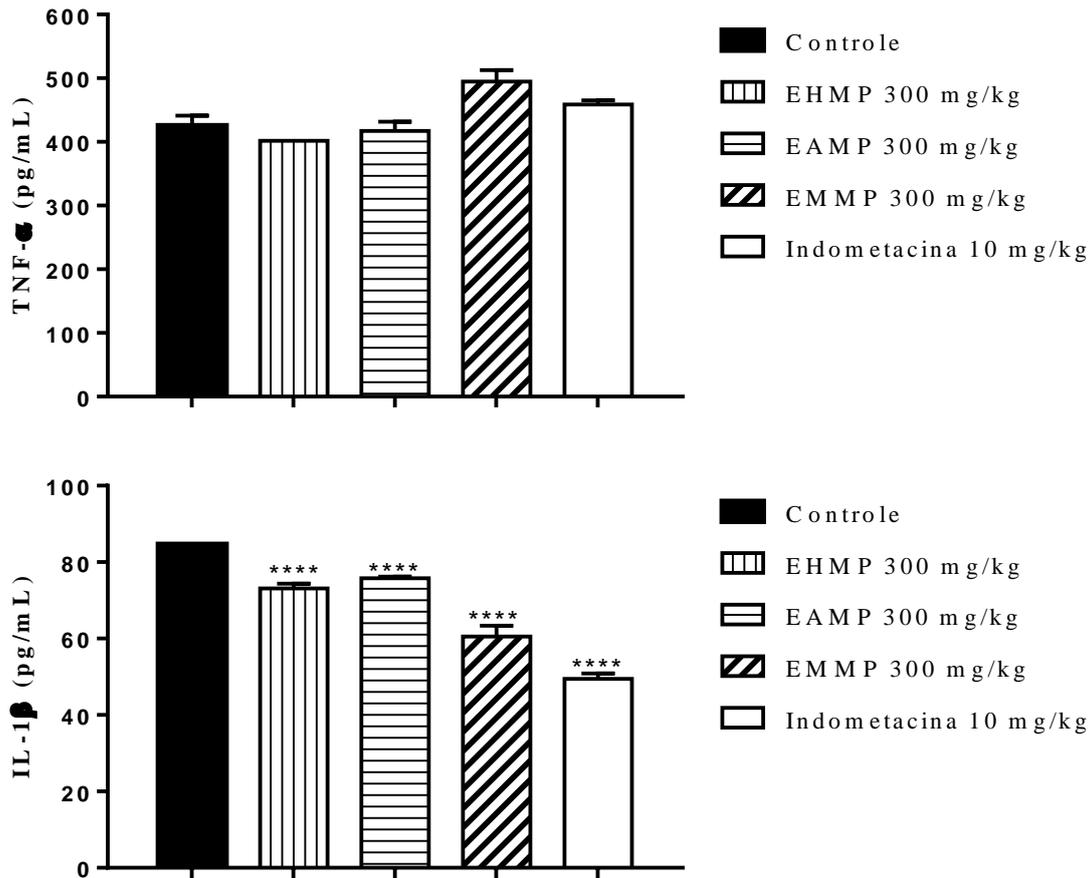


Figura 1 – Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre os níveis de citocinas no exsudato inflamatório. Dados representam média \pm DP, (N=5); ** $P < 0,01$, **** $P < 0,0001$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

3.4 Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre o edema de pata em ratos induzido por carragenina 1%

O pré-tratamento com EAMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg reduziu o volume do edema induzido pelo carragenina, especialmente a dose de 300 mg/kg que apresentou atividade semelhante à indometacina na primeira e segunda hora após a indução da inflamação (Tabela 2). EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg reduziu o volume do edema induzido por carragenina 1%. Na primeira hora, todas as doses apresentaram atividade similar à indometacina. No entanto, apenas a dose de 300 mg/kg manteve-se com atividade semelhante a indometacina em todas as medições. O EMMP atingiu a sua maior inibição (71%) na 1ª hora após a indução da inflamação, enquanto que a indometacina inibiu 75% da formação do edema.

Tabela 2 – Efeito de EMMP e EAMP sobre edema de pata em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do edema de pata (mL)			
		1h	2h	3h	4h
Controle	-	0,45 ± 0,08	0,94 ± 0,10	1,38 ± 0,06	1,34 ± 0,11
EAMP	30	0,32 ± 0,03 (29%)	0,83 ± 0,09 (12%)	1,07 ± 0,10**** (22%)	0,99 ± 0,09**** (26%)
	100	0,30 ± 0,04* (33%)	0,64 ± 0,09**** (32%)	0,93 ± 0,12**** (33%)	0,86 ± 0,10**** (36%)
	300	0,17 ± 0,02****# (62%)	0,28 ± 0,05****# (70%)	0,76 ± 0,06**** (45%)	0,65 ± 0,08**** (51%)
EMMP	30	0,22 ± 0,02****# (51%)	0,45 ± 0,07**** (52%)	0,71 ± 0,12**** (49%)	0,63 ± 0,07**** (53%)
	100	0,16 ± 0,01****# (64%)	0,35 ± 0,03****# (63%)	0,60 ± 0,06**** (57%)	0,51 ± 0,07**** (62%)
	300	0,13 ± 0,06****# (71%)	0,30 ± 0,07****# (68%)	0,48 ± 0,02****# (65%)	0,50 ± 0,08****# (62%)
Indometacina	10	0,11 ± 0,02**** (75%)	0,27 ± 0,06**** (71%)	0,42 ± 0,07**** (70%)	0,52 ± 0,01**** (61%)

Dados representam média ± DP volume do edema (mL) nos tempos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina a 1% (N=5); * $P < 0,05$, **** $P < 0,0001$ v.s Controle. # - não significativo v.s indometacina. ANOVA duas vias seguido do teste de Bonferroni. EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

3.6 Efeito dos extratos de *M. prasina* sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1% em camundongos

O pré-tratamento com EAMP e EMMP inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético (Figura 2). O EAMP na dose de 300 mg/kg reduziu significativamente a exsudação do azul de Evan em 72% e semelhante à indometacina (10 mg/kg). O EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg (59 e 69%, respectivamente) também inibiram o aumento da permeabilidade vascular peritoneal de forma semelhante à indometacina (64%).

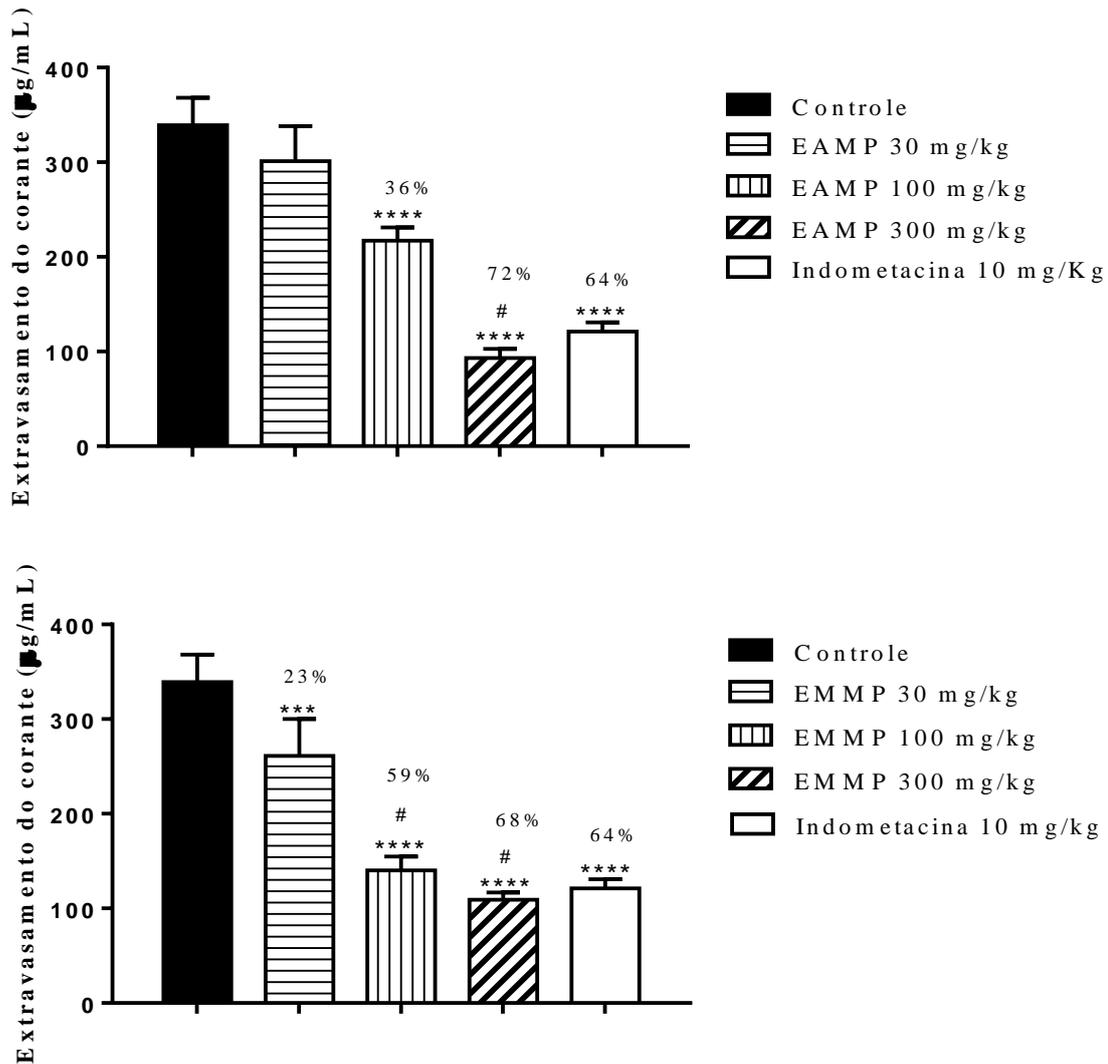


Figura 2 – Efeito do EAMP e EMMP sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético 1%. Dados representam média \pm DP do extravasamento do corante azul de Evans ($\mu\text{g/mL}$) 30 minutos após a injeção de ácido acético a 1% (N=5); *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ v.s Controle. # - não significantivo v.s indometacina. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni. EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

4. DISCUSSÃO

O gênero *Miconia* é o mais representativo da família Melastomataceae, e algumas espécies são comumente usadas na medicina popular brasileira como agentes anti-inflamatórios. Embora um grande número de compostos tenham sido isolados de espécies da família de Melastomataceae, apenas algumas espécies foram extensivamente estudadas. Os principais constituintes desta família pertencem a terpenoides, fenólicos simples, quinonas, lignanas e seus glicosídeos, bem como uma vasta gama de taninos ou polifenóis [32]. Neste estudo foi detectada a presença de vários metabólitos secundários como alcaloides, flavonoides, taninos, cumarinas e terpenoides. Tarawneh et al. [24] isolaram seis flavanonas do caule de *M. prasina*, onde três desses compostos exibiram baixa afinidade de ligação ao receptor canabinóide CB2. O receptor CB2 é um dos componentes do sistema

canabinóide endógeno que está envolvido principalmente em ações anti-inflamatórias e imunossupressoras. A ativação seletiva do receptor CB2 tem o potencial de fornecer os efeitos anti-inflamatórios dos canabinóides sem os efeitos psicoativos [33]. Com base no potencial químico e farmacológico deste gênero, este trabalho investigou a atividade anti-inflamatória das folhas de *Miconia prasina*.

A avaliação de toxicidade aguda possibilita a verificação e classificação de substâncias ou extratos quanto à sua capacidade de provocar danos e letalidade aos organismos vivos. De acordo com a metodologia empregada, os extratos de *M. prasina* não produziram sinais de intoxicação e nem alterações comportamentais, fisiológicas ou hematológicas. O valor DL50 para a administração oral destes extratos foi estimado em maior que 2000 mg/kg, enquadrando-se na Classe 5 de toxicidade [26].

O modelo de bolsão de ar induzido por carragenina é caracterizado pela formação de uma fina membrana constituída por fibroblastos, macrófagos e mastócitos [34, 35], com infiltração de polimorfonuclear e liberação de mediadores pró-inflamatórios como prostaglandina E2 (PGE2), interleucina-6 (IL-6), interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral (TNF- α) [36, 37]. Este modelo é amplamente utilizado para a triagem de drogas antiartríticas [28, 38]. Os extratos de *M. prasina* (30, 100 e 300 mg/kg) reduziram a migração de leucócitos para a bolsão de ar, especialmente EMMP, que obteve a percentagem mais elevada de inibição na dose de 300 mg/kg (74%). EHMP, EAMP e EMMP (300 mg/kg) reduziram os níveis de IL-1 β . Esta citocina é um componente importante das respostas inflamatórias e imunes. A IL-1 β atua de forma sinérgica com TNF- α aumentando a expressão de moléculas de adesão em células endoteliais, promovendo a diapedese de leucócitos na resposta inflamatória aguda. A IL-1 também induz a liberação de conteúdo específico de grânulos de neutrófilos humanos, a síntese de outra interleucina por monócitos e induz a produção de várias enzimas, tais como fosfolipase A2, ciclooxigenase 2 (COX-2) e sintase indutível de óxido nítrico (iNOS), conduzindo a liberação de PGE2 e NO, o que contribui para respostas inflamatórias locais e sistêmicas [39, 40]. No entanto, os extratos e indometacina não reduziram os níveis de TNF- α no exsudado da bolsa de ar.

A inflamação induzida por carragenina na pata do rato representa um modelo clássico de formação de edema e hiperalgesia, que tem sido amplamente utilizado no desenvolvimento de fármacos anti-inflamatórios não esteróides [41]. O desenvolvimento do edema induzido pelo carragenina é um modelo bifásico, com o participação de vários mediadores para produzir a resposta inflamatória [42]. Na primeira fase (0-1 h), ocorre a liberação de histamina, serotonina e bradicinina [43], que promovem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. A fase secundária (após 1 h) está correlacionada com a ativação da COX-2 e alta produção de PGE2 [44, 45]. Esta fase também envolve a infiltração de neutrófilos e a liberação de outros mediadores importantes, tais como TNF- α , IL-1 β

e NO [42, 45, 46]. Nossos resultados mostraram que EAMP e EMMP foram eficazes na redução do edema de pata nas duas fases de inflamação induzidas pela carragenina. Com base nessa observação, o efeito anti-inflamatório demonstrado pelos extratos pode ser atribuído à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como histamina, prostaglandinas, IL-1 β e NO.

A injeção de ácido acético induz uma inflamação exsudativa devido a liberação de mediadores químicos como PGE2, histamina, bradikina e serotonina, além de estimular as terminações nervosas diretamente pela redução do pH [47, 48]. A inibição desses mediadores contribui para reduzir a vasodilatação, inibir o aumento da permeabilidade vascular e a migração de neutrófilos para o local inflamatório, e consequentemente reduzir a formação de edema [30]. Corroborando com os resultados anteriores, EAMP e EMMP reduziram o aumento da permeabilidade vascular induzida pelo ácido acético.

5. CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que os extratos hexano, acetato de etila e metanol de *M. prasina* possuem propriedades anti-inflamatórias atribuídas à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios, como histamina, prostaglandinas, IL-1 β e NO.

CONTRIBUIÇÕES DOS AUTORES

Este trabalho foi realizado em colaboração entre todos os autores. Autores TBO e TGS delinearão o estudo e escreverão o manuscrito. Autores ASHSGG, IVGB e CHRCJ realizaram os experimentos e realizaram a análise estatística. O autor TCCL realizou a obtenção dos extratos e a cromatografia em camada delgada.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no Brasil. Os financiadores não tiveram papel em design de estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

REFERÊNCIAS

1. Vendramini-Costa DB, Carvalho JE. Molecular link mechanisms between inflammation and cancer. *Current Pharmaceutical Design*. 2012; 18: 3831-3852.
2. Iwalewa EO, Mcgaw LJ, Naidoo V, Eloff JN. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. *African Journal of Biotechnology*. 2007; 25: 2868-2885.
3. Shah BN, Patel NP, Pandya P. Role of leukotriene in inflammation and antileukotriene therapy. *Journal of Pharmacy Research*. 2008; 1: 113-123.

4. Franks AL, Slansky JE. Multiple Associations between a Broad Spectrum of Autoimmune Diseases, Chronic Inflammatory Diseases and Cancer. National Institutes of health. 2012; 32(4): 1119–1136.
5. Arfè A, Scotti L, Varas-Lorenzo C, Nicotra F, Zambon A, Kollhorst B et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of heart failure in four European countries: nested case-control study. The BMJ. 2016; 354 (i4857): 1-11.
6. Patrono C, Rocca B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. Pharmacological Research. 2009; 59(5): 285-289.
7. Goldenberg R, Baumgratz JFA, Souza MLR. Taxonomia de Melastomataceae no Brasil: retrospectiva, perspectivas e chaves de identificação para os gêneros. Rodriguésia. 2012; 63(1): 145-161.
8. Cruz AVM, Kaplan MAC. Uso medicinal de espécies da família Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. Floresta e Ambiente. 2004; 11(1): 47-52.
9. Fenner R, Betti AH, Mentz LA, Rates SMK. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. Revista brasileira de Ciências Farmacêuticas. 2006; 42 (3): 369-394.
10. Vasconcelos MAL, Ferreira MLDS, Andrade E Silva R et al. Analgesic effects of crude extracts of *Miconia albicans*. Bollettino Chimico Farmaceutico. 2003; 142: 333-335.
11. Vasconcelos MAL, Royo VA, Ferreira DA Crotti AEM, et al. *In vivo* analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanoic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). Z. Naturforsch. 2006; 6: 477-482.
12. Serpeloni JM, Barcelos GRM, Mori MP, Yanagui K, Vilegas W, Varanda EA, et al. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the *Miconia* genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis. Experimental and Toxicologic Pathology. 2011; 63 (5): 499-504.
13. Cunha WR, Silva MLA, Santos FM, Montenegro IM, Oliveira ARA, Tavares HR Leme Dos Santos, et al. In Vitro Inhibition of Tumor Cell Growth by *Miconia fallax*. Pharmaceutical Biology. 2008; 46(4): 292–294.
14. Cunha WR, Matos GX, Souza MGM, Tozatti MG, Andrade E Silva ML, Martins CHG et al. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. Pharmaceutical Biology. 2010; 48 (20): 166-169.
15. Pieroni LG, Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL. Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves. Molecules. 2011;16: 9439-9450.
16. Mosquera OM, Corraera YM, Niño J. Antioxidant activity of plants from Colombian flora. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2009; 19(2A): 382-387.
17. Peixoto JA, Silva MLA, Crotti AEM, Veneziani RCS, Gimenez VMM, Januário AH et al. Antileishmanial activity of hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffi*, isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. Molecules. 2011; 16: 1825-1833.
18. Tarawneh AH, León F, Ibrahim MA, Pettaway S, Mccurdy CR, Cutler SJ. Flavanones from *Miconia prasina*. Phytochemistry letters. 2014; 7: 130-132.
19. Zhang Z, ElSohly HN, Li XC, Khan SI, Broedel SE Jr, Raulli RE, Cihlar RL, Walker LA. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. J Nat Prod. 2003; 66: 39–41.
20. Gunatilaka AAL, Berger JM, Evans R, Miller JS, Wisse JH, Neddermann KM, et al. Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive Benzoquinones from *Miconia lepidota* from the Suriname rainforest. Journal of Natural Products. 2001; 64 (1): 2-5.
21. Rodrigues J, Rinaldo D, Dos Santos LC, Vilegas W. An unusual C6–C6 linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). Phytochemistry. 2007; 68:1781–4.
22. Celotto AC, Nazario DZ, Spessoto MA, Martins CHG, Cunha WR. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. Brazilian Journal of Microbiology. 2003; 34: 339-340.

23. Peixoto AL, Rosa MMT, Silva IM. Caracterização da Mata Atlântica. In: SYLVESTRE L.S.; ROSA, M.M.T. (Eds.). 2002. Manual metodológico para estudos botânicos na Mata Atlântica. pp. 9-23.
24. Tarawneh AH, León F, Ibrahim MA, Pettaway S, Mccurdy CR, Cutler SJ. Flavanones from *Miconia prasina*. Phytochemistry letters. 2014; 7: 130-132.
25. Wagner H, Bladt S. Plant drug analysis - a thin layer chromatography atlas. 2.ed. Berlin: Springer, 1996. 384 p.
26. OECD- Organization for Economic Co-operation and Development. Guideline 423: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. OECD, Paris, 2001. 14p.
27. Malone MH, Robichaud RCA. Hippocratic screening for pure or drug materials. Lloydia. 1962; 25: 23-53.
28. Guerra ASHS, Malta DJN, Laranjeira LPM, Maia MBS, Colaço NC, Lima MCA, et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazoline derivatives. International Immunopharmacology. 2011; 11(11): 1816-1822.
29. Winter CA, Risley EQ, Nuss GW. Carrageenan-induced edema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. Proc Soc Exp Biol Med. 1962; 1:547-554.
30. Whittle BA. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. Br J Pharmacol Chemother. 1964; 2: 246-253.
31. Yesilada E, Tanaka S, Sezik E, Tabata M. Phytochemical analysis and allelopathic activity of oils of *Ecballium elaterium* A. Richard growing in Iran. Journal of Natural Products. 1988; 51: 504-508.
32. Serna DMO, Martínez. Phenolics and polyphenolics from melastomataceae. Molecules. 2015; 20:17818-17847.
33. Asthon JC, Glass M. The cannabinoid CB2 receptor as target for inflammation-dependent neurodegeneration. Current Neuropharmacology. 2007; 5: (2) 73-80.
34. Edwards JC, Sedgwick AD, Willoughby DA. The formation of a structure with the features of synovial lining by subcutaneous injection of fibrin in vivo tissue culture system. Journal of Pathology. 1981; 134 (2): 147-156.
35. Sin YM, Sedgwick AD, Willoughby DA. Mast cells in newly formed lining tissue during acute inflammation: a six-day air pouch model in the mouse. Annals of the Rheumatic disease. 1986; 45: 873-877.
36. Sedgwick AD, Lees PA. A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. Agents Actions. 1986; 18 (3-4): 439-436.
37. Romano M, Faggioni R, Sironi M, Sacco S, Echtenacher B, Di Santo E et al. Carrageenan-induced acute inflammation in the air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor. Mediators of Inflammation. 1997; 6: 32-38.
38. Malta DJN, Araújo LCC, Carrazoni ASG, Mota FBV, Silva SC, Carmino MAS, et al. Anti-inflammatory, Antiarthritic and Antinociceptive Activities of 3,5-Disubstituted Thiazolidine Derivatives. British Journal of Pharmaceutical Research. 2014; 4(8): 992-1003.
39. Gabay C, Lamacchia C, Palmer G. IL-1 pathways in inflammation and human diseases. Nat Rev Rheumatol. 2010; 6 (4):232-4.
40. Moura HV, Pomerantzeff PMA, Gomes WJ. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. Revista brasileira de Circulação Cardiovascula. 2001; 16 (4): 376-387.
41. Guay J, Bateman K, Gordon R, Macini J, Riendeau D. Carrageenan-induced paw edema in rat elicits a predominant prostaglandin E2 response in the central nervous system associated with the induction of microsomal PGE2 synthase-1. J Biol Chem. 2004; 279: 24866-24872.
42. Vinegar R, Schreiber W, Hugo R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. J. pharmacol. Exp. Ther. 1969; 166 : 96 -103.
43. Di Rosa M, Giroud Jp, Willoughby Da. Studies of mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenin and turpentine. J. Pathol. 1971; 104: 15 - 29.

44. Seibert K, Zhang Y, Leahy K, Hauser S, Masferrer J, Perkins W, et al. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1994; 91: 12013-12017.
45. Morris CJ. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods in Molecular Biology.* 2003; 225: 115-121.
46. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino DH, Manning PT, et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology.* 1996; 118: 829-838.
47. Guo L, Li J, Ye H, Zheng R, Hao X J, Chen W Y, et al. Anti-inflammatory and analgesic potency of carboxyamidotriazole, a tumoristatic agent. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics.* 2008; 325: 10-16.
48. França DS, Souza AL, Almeida KR, Dolabella SS, Martinelli C, Coelho MMB. Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. *European Journal of Pharmacology.* 2001; 421 (3): 157-164.

APÊNDICE B - MANUSCRITO 2**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E HEPATOPROTETORA DO EXTRATO METANÓLICO DE *Miconia prasina* (Sw.) DC. SOBRE DANOS HEPÁTICOS INDUZIDOS POR ACETAMINOFENO EM CAMUNDONGOS**

Tatiane Bezerra de Oliveira^{1*}, Natalie Emanuelle Ribeiro e Silva¹, Maria Aparecida da Conceição de Lira⁴, Pedro Paulo Marcelino Neto¹, Allan Jonathan Chernichiarro Corrêa², Marllon Alex Nascimento Santana¹, Jeymesson Raphael Cardoso Vieira³, Elba Lúcia Cavalcante de Amorim², Isla Vanessa Gomes Alves Bastos¹, Teresinha Gonçalves da Silva¹

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

²Laboratório de Produtos Naturais, Centro de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

³Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

⁴Pós-graduação em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.

*Corresponding author at: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil.

Tel.: +55 81 21268347; fax: +55 81 21268346.

E-mail address: tatianebezerradeoliveira@gmail.com

RESUMO

O presente estudo foi projetado para investigar as atividades antioxidantes e hepatoprotetoras do extrato metanólico das folhas de *Miconia prasina* (Sw) DC (EMMP). A determinação fitoquímica e do conteúdo total de compostos fenólicos e flavonóides foram determinados. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de sequestro de radicais 2,2'-azino-bis- (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) (ABTS) e 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH), pelo capacidade antioxidante total antioxidante e pelo poder de redução férrica (FRAP). A atividade hepatoprotectora do EMMP foi determinada pelo doseamento sérica das enzimas hepáticas, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) em camundongos. Fragmentos dos fígados foram submetidos à análise histológica. O alto teor de compostos fenólicos em EMMP resultou em uma grande capacidade de sequestro de radicais livres e poder de redução de ferro na atividade antioxidante. O EMMP não reduziu os níveis das enzimas hepáticas AST, ALT e ALP e a análise histopatológica indicou que a EMMP não impediu a necrose induzida por acetaminofeno. Estes resultados sugerem que a EMMP tem atividade antioxidante, mas não possui efeitos hepatoprotetores no dano hepático induzido por acetaminofeno em camundongos.

Palavra-chave: Melastomataceae, injúria hepática, hepatotoxicidade, compostos fenólicos.

Este manuscrito será submetido ao periódico **BMC Complementary and Alternative Medicine**.

INTRODUÇÃO

O fígado é um órgão-chave para o metabolismo de substâncias no organismo [1]. Apesar de sua considerável capacidade regenerativa, exposições contínuas e variadas a xenobióticos, poluentes ambientais e agentes quimioterapêuticos podem suprimir e/ou superar os mecanismos naturais de proteção do fígado, levando ao mal funcionamento e a lesões, hepática [2]. A ingestão excessiva de etanol, tetracloreto de carbono (CCl₄) e ferro podem prejudicar o metabolismo dos ácidos graxos [3], a síntese de proteínas [4] e a desintoxicação [5], causando o acúmulo de radicais livres no corpo [6]. O consumo excessivo de acetaminofeno provoca necrose hepática e inflamação por meio da ativação do citocromo P450 que forma o metabólito reativo N-acetil-pbenzoquinoneimina (NAPQI) [7, 8]. Durante o processo, espécies reativas de oxigênio (ROS) são produzidas excessivamente [9].

No organismo, as espécies reativas de oxigênio (ROS) e as espécies reativas de nitrogênio (RNS) estão envolvidas em processos metabólicos, como a produção de energia, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular, fagocitose e síntese de moléculas biológicas importantes [10, 11]. A quantidade de radicais livres no corpo é equilibrada pela disponibilidade de antioxidantes, que são compostos capazes de prevenir a formação de radicais livres ou de reagir diretamente com eles. O desequilíbrio dos radicais livres / antioxidantes em favor dos radicais livres pode levar ao estabelecimento do estresse oxidativo, uma situação caracterizada por comprometimento biomolécula e conseqüentemente pelo risco a saúde [12].

Os efeitos terapêuticos de vários medicamentos derivados de plantas naturais estão correlacionados com a atividade antioxidante [13]. Entre as moléculas produzidas por plantas, os polifenóis são uma das classes amplamente estudadas, cuja capacidade antioxidante notável é creditada principalmente devido às suas propriedades redutoras e estrutura química [14].

Estudos fitoquímicos da família Melastomataceae identificaram e isolaram diversos compostos como terpenoides, fenólicos simples, flavonóides, quinonas, lignanas e seus glicosídeos, bem como uma vasta gama de taninos. Várias espécies de Melastomataceae possuem atividade antioxidante [15, 16, 17]. O extrato de metanol das folhas de *Melastoma malabathricum* exibiu hepatoproteção no modelo de lesão hepática induzida por paracetamol, que pode ser, em parte, atribuída à sua atividade antioxidante [18, 19].

A investigação anterior de nosso grupo de pesquisa demonstrou que o extrato metanólico de *Miconia prasina* possui altos níveis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Com base nestes resultados preliminares, realizamos a avaliação da atividade hepatoprotetora do extrato metanólico de *M. prasina*.

METODOLOGIA

Produtos químicos

Reagente Folin-Ciocalteu; 2, 2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH); Cloreto de alumínio hexahidratado ($\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$); Cloreto férrico (FeCl_3); Molibdato de amônio; 2, 2 azo bis, 3-etilbenzotiololina-6-sulfônico (ABTS); ácido ascórbico; Persulfato de potássio ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$); Ácido Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico); Ácido tânico; cumarina e a rutina foram adquiridas da Sigma Co. (St. Louis, EUA).

Material vegetal

As folhas de *Miconia prasina* foram coletadas em Rio Largo, Alagoas, Brasil. A espécie foi identificada pelo botânico Earl Celestino de Oliveira Chagas do Instituto Ambiental de Alagoas (IMA-AL). Um exsicata (nº 50398) foi depositada no herbário IMA-AL.

Preparação do extrato vegetal

O pó seco das folhas de *M. prasina* foi extraído por maceração à temperatura ambiente com hexano durante sete dias. O extrato foi filtrado e o resíduo foi extraído com acetato de etila durante sete dias. O extrato foi filtrado e o resíduo foi macerado com metanol durante sete dias. Os filtrados foram evaporados sob pressão reduzida para dar o extrato de hexano (EHMP), extrato de acetato de etila (EAMP) e extrato metanólico (EMMP).

Quantificação do teor fenóis totais e taninos

A quantificação dos fenóis totais foi realizada através do método de Folin-Ciocalteu, o qual envolve a redução do reagente por compostos fenólicos da amostra com a formação de um complexo azul no qual a sua intensidade aumenta linearmente [22]. As soluções estoque dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram preparadas na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, adicionou-se 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu a 10%, 1 mL da solução de carbonato de sódio e completou o volume para 10 mL com água destilada. As amostras permaneceram por 30 minutos no escuro em temperatura ambiente e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 760 nm. Foram avaliadas seis repetições de cada extrato. A equação de calibração do ácido tânico foi $y = 0,0839x + 0,0134$ ($R^2 = 0,9902$) e os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de ácido tânico por grama do extrato (mg EAT/g). Para quantificar os fenóis residuais, 1 g de caseína foi adicionado em 12 mL de água destilada e adicionado 6 mL dos extratos na concentração de 1 mg/mL . Após três horas de reação sob agitação, a solução foi filtrada e adicionado 7 mL de água destilada. Uma alíquota de 1 mL da

solução foi retirada e quantificada pelo método Folin-Ciocalteu. O teor de taninos é calculado pela diferença entre o conteúdo de fenóis totais e fenóis residuais.

Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides foi obtida pelo método descrito por Peixoto Sobrinho et al. [23], com modificações. As soluções estoque dos extratos EHMP, EAMP e EMMP foram preparadas na concentração de 200 µg/mL. Um volume de 0,2 mL dos extratos foram transferidas, em triplicata, para tubo de ensaio. A cada tubo de ensaio foram acrescentados 0,12 mL de ácido acético glacial, 2 mL da solução metanólica de piridina a 20%, 0,5 mL do reagente cloreto de alumínio em metanol a 5%, completando-se o volume até 10 mL com água destilada. Após 30 minutos em temperatura ambiente e protegido da luz, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro a 420 nm em cubetas de quartzo. De forma semelhante ao procedimento foi construído uma curva com o padrão rutina. A equação de calibração de rutina foi $y = 0,0299x + 0,0015$ ($R^2 = 0,9991$). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de rutina por grama do extrato (mg ER/g).

Quantificação do teor de cumarinas

Para determinar o teor de cumarinas foi utilizado o método descrito por Osório e Martins [24], com modificações. Os extratos EHMP, EAMP e EMMP foram diluídos em metanol na concentração de 1 mg/mL. Em seguida, 0,5 mL dos extratos foram transferidos em triplicata para tubos de ensaio, adicionado 2 mL de água destilada e 500 µL de uma solução de acetato de chumbo a 5%. As amostras foram agitadas, e em seguida foi adicionado 7 mL de água destilada. Posteriormente, foi transferido 2 mL desta solução para novos tubos de ensaio, adicionado 8 mL de solução de ácido clorídrico a 0,1 M e mantidos em temperatura ambiente ao abrigo da luz por 30 min. A absorbância foi medida em espectrofotômetro a 320 nm. De forma semelhante ao procedimento foi construído uma curva com o padrão cumarina (Sigma-Aldrich). A equação de calibração de cumarina foi $y = 0,0215x + 0,0085$ ($R^2 = 0,9937$). Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de cumarina por cada grama do extrato (mg EC/g).

Método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•)

A avaliação da atividade sequestradora do radical DPPH• foi determinada através da metodologia descrita por Brand-Williams [25], com modificações. As soluções estoques dos extratos foram preparadas nas concentrações de 1,0 e 5,0 mg/mL. Os extratos foram diluídos em etanol nas concentrações de 5 a 500 µg/mL, e alíquotas de 30 µL dessas soluções foram distribuídas em triplicata numa placa de 96 poços. Em seguida, 270 µL da solução de DPPH• (23,6 µg/mL em etanol) foi adicionado aos poços e incubado por 30 minutos protegido da luz. O ácido ascórbico foi utilizado

como controle positivo. A absorvância foi lida em espectrofotômetro de placa a 517 nm. A atividade sequestradora foi expressa como concentração efetiva para obter 50% de atividade antioxidante (CE_{50}) utilizando a análise de regressão linear, obtida pelo programa estatístico GraphPad Prism 6.0.

Método de sequestro de radicais livre 2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato (ABTS⁺))

Para realização deste ensaio, foi utilizada a metodologia descrita por Re et al. [26]. O radical ABTS⁺ (2,2-azobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato) foi formado a partir da reação de 7 mM de ABTS com 140 mM de persulfato de potássio, os quais foram incubados à temperatura ambiente e na ausência de luz, por 12-16 horas (tempo necessário para a formação do radical). Transcorrido esse período, a solução foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de 0,70 (\pm 0,05) a 734 nm. Foram misturados 30 μ L de extratos de plantas (1 mg/mL) com 3 mL da solução de trabalho e deixados em repouso durante 6 min antes de se medir a absorvância a 734 nm. O Trolox foi utilizado como controle positivo e a solução de trabalho como controle negativo. A atividade sequestradora do radical ABTS foi expressa em percentagem de inibição de ABTS⁺ de acordo com a equação:

$$\text{Inibição do ABTS (\%)} = [(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra}) / \text{Abs controle}] \times 100$$

Determinação da capacidade antioxidante total pelo método do fosfomolibdênio.

Para a avaliação da atividade antioxidante total empregou-se o método do complexo fosfomolibdênio, formado pela reação da solução de fosfato sódico monobásico (28 mL, 0,1 mol/L), solução de molibdato de amônio (12 mL, 0,3 mol/L) e solução de ácido sulfúrico (20 mL, 3 mol/L), em meio aquoso, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL. Os extratos foram diluídos a concentração de 1 mg/mL e alíquotas de 0,3 mL foram adicionadas em tubos de ensaio com 3,0 mL do reagente fosfomolibdênio. Os tubos foram tampados e levados ao banho de água a 95 °C por 90 minutos. Após resfriamento procedeu-se a leitura da absorvância a 695 nm em espectrofotômetro. Todas as análises foram realizadas em triplicata, como branco foi utilizado 1 mL do reagente mais 0,1 mL de metanol [27]. A capacidade antioxidante total (CAT) das amostras foi expressa em relação ao ácido ascórbico, considerando sua absorvância correspondente a 100% de atividade antioxidante.

$$\text{CAT (\%)} = [(\text{Absorbância amostra} - \text{absorbância branco}) / (\text{absorbância ácido ascórbico} - \text{absorbância branco})] \times 100$$

Potencial antioxidante de redução de ferro (FRAP).

Para a determinação da capacidade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) foi utilizado o procedimento descrito por Benzie e Strain [28]. Este ensaio se baseia na medida direta da habilidade dos antioxidantes da amostra em reduzir, em meio ácido (pH 3,6), o complexo Fe^{3+} /tripiridiltriazina (TPTZ), para formar Fe^{2+} , de intensa cor azul e absorção máxima a 593 nm. No ensaio FRAP, soluções de tampão acetato, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (20 mM) e TPTZ (10 mM) foram adicionadas na proporção 10:1:1, originando o reagente FRAP. As amostras dos extratos de *M. prasina* foram diluídas em metanol (1mg/mL). Em seguida, alíquotas (0,2 mL) de cada extrato foram misturadas com 1,8 mL do reagente FRAP e após incubação em banho-maria a 37 °C durante 30 min a absorbância da reação foi medida a 593 nm em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de FeSO_4 /g de extrato, interpolando este valor na curva de calibração construída com o padrão FeSO_4 , em diferentes concentrações (125 a 1 000 $\mu\text{g/mL}$). O Trolox foi utilizado como controle positivo.

Animais

O estudo foi realizado com camundongos albinos suíços machos (25-30 g) obtidos do biotério do Departamento de antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco, Brasil. Os camundongos foram mantidos em gaiolas de policarbonato sob condições padrão (temperatura 22 ± 2 °C) com ciclo claro / escuro de 12 h. Eles receberam ração balanceada e água potável *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da UFPE para o uso de animais experimentais (N ° 23076.030375 / 2014-20).

Determinação da atividade hepatoprotetora contra intoxicação com acetaminofeno

Camundongos machos foram divididos em sete grupos de cinco animais e foram pré-tratados por via oral durante sete dias consecutivos com EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, silimarina (200 mg/kg) e salina (9% NaCl), como descrito abaixo. No oitavo dia, os camundongos receberam por gavagem acetaminofeno (250 mg/kg), exceto os grupos controle salina e EMMP satélite [18]. Após 12 horas, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) e o sangue foi coletado por punção cardíaca, centrifugado a 4000 rpm por 10 minuto. O soro obtido foi analisado em BIO 2000 (BIOPLUS, São Paulo, Brasil) utilizando kits bioquímicos Labtest (São Paulo, Brasil) para os seguintes parâmetros: alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST) e fosfatase alcalina (ALP). Após a eutanásia, um lóbulo hepático de cada animal foi conservado em formalina tamponada a 10% para posterior análise histológica.

Grupo I – Controle negativo: solução salina (10 mL/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo II – Controle salina: solução salina (10 mL/kg) – não recebeu acetaminofeno

Grupo III – EMMP (30 mg/kg) + acetaminofeno 250 mg / kg

Grupo IV – EMMP (100 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo V – EMMP (300 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Grupo VI – EMMP satélite (300 mg/kg) – não recebeu acetaminofeno

Grupo VII – Silimarina (200 mg/kg) + acetaminofeno (250 mg/kg)

Análise histológica

Após a eutanásia, um lóbulo hepático de cada animal foi preservado em 10% de formalina tamponada. Após a desidratação dos tecidos com banhos sucessivos em álcool e diafanização com xilol, as peças foram incluídas em parafina. As fatias de 5 µm de espessura foram colhidas em lâminas e coradas com hematoxilina e eosina e foram observadas sob um microscópio de luz. As fotomicrografias foram obtidas no Panoramic Desk Scanner (3DHitech, Budapeste, Hungria) com o Panoramic Viewer (3DHitech).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± D.P. As diferenças entre os grupos serão determinadas por Análise de Variância (ANOVA - one way), seguido do teste de Bonferroni. As análises foram feitas usando o programa GraphPad Prism 6.0.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Doseamento de fenóis totais, tanino, flavonoides e cumarinas.

O extrato EMMP apresentou maior teor de fenóis totais e taninos em comparação aos EHMP e EAMP (Tabela 1) provavelmente, devido à afinidade dessas substâncias pelo solvente empregado. Substâncias fenólicas têm maior afinidade por solventes polares [33, 34]. EAMP apresentou maior teor de flavonoides, enquanto que EHMP apresentou maior teor de cumarina.

A maioria dos constituintes químicos relatados na família Melastomataceae pertence a compostos polifenólicos. Análises fitoquímicas dos extratos do gênero revelaram a presença de flavonoides (quercetina, miricetina e kaemferol), triterpenos (ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido arjunólico), cumarinas e esteróis (sitosterol, estigmasterol) [29, 30, 31, 32].

Tabela 1 – Teor de fenóis totais, taninos, flavonoides e cumarina nos extratos de *M. prasina*.

Extratos	Fenóis Totais (mg EAT/g)	Taninos (mg EAT/g)	Flavonoides (mg ER/g)	Cumarina (mg EC/g)
EHMP	46,24 ± 0,76	14,17 ± 1,16	ND	470,29 ± 0,45
EAMP	97,56 ± 7,49	51,37 ± 4,25	287,31 ± 5,58	372,01 ± 17,81
EMMP	139,31 ± 8,69	77,44 ± 7,05	16,91 ± 1,63	250,30 ± 7,45

ND: não determinado; mg EAT/g - miligramas equivalentes de ácido tânico; mg ER/g - miligramas equivalentes de rutina; mg EC/g - miligramas equivalentes de cumarina. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Atividade antioxidante pelos método DPPH, ABTS, complexo fosfomolibdênio e FRAP.

A atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* pelos métodos DPPH, ABTS, complexo de fosfomolibdênio e FRAP estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* pelo método DPPH, ABTS, Fosfomolibdênio e FRAP.

Extratos	DPPH EC ₅₀ (µg/mL)	ABTS ⁺ (%)	Fosfomolibdênio (CAT%)	FRAP (µ FeSO ₄ / mg)
EHMP	> 500	42,35 ± 3,02	50,30 ± 2,69	2,66 ± 0,09
EAMP	34,04 ± 1,58	39,33 ± 0,13	72,72 ± 1,23	3,35 ± 0,67
EMMP	7,94 ± 0,04	55,47 ± 6,49	67,28 ± 5,67	15,86 ± 0,92
Trolox	-	64,20 ± 0,10	-	24,70 ± 0,41
Ácido Ascórbico	4,82 ± 0,06	-	-	-

Valores de CE₅₀ foram obtidos a partir da análise de regressão linear, com 95% de nível de confiança. Valores em médias ± desvio padrão. FRAP: Poder antioxidante de redução do Ferro. %CAT: Porcentagem da atividade antioxidante total. EHMP: Extrato hexânico de *M. prasina*; EAMP: Extrato acetato de etila de *M. prasina*; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Os ensaios de sequestro de radicais DPPH e ABTS são métodos baseados na eliminação destes radicais pela substância dadora de próton, a reação é seguida por uma alteração mensurável na espectrofotometria [35]. Ambos os ensaios DPPH e ABTS são amplamente utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de produtos naturais [36]. Os resultados do DPPH foram expressos em CE₅₀ (concentração de extrato em µg/mL capaz de reagir com 50% do radical presente na solução de DPPH). Portanto, quanto menor o valor do CE₅₀, maior será a atividade antioxidante do extrato. EMMP apresentou a maior capacidade de sequestro de radicais livres (CE₅₀ 7,94 ± 0,04 µg/mL), seguido EAMP (EC₅₀ 34,04 ± 1,58 µg/mL). EHMP não apresentou atividade antioxidante (CE₅₀ > 500 µg/mL). O ácido ascórbico utilizado como controle positivo demonstrou CE₅₀ 4,82 ± 0,06 µg/mL.

A atividade de eliminação de radicais ABTS foi maior para EMMP ($55,47 \pm 6,49\%$); seguido por EHMP ($42,35 \pm 3,02\%$) e EAMP ($39,33 \pm 0,13\%$).

A capacidade antioxidante total (TAC) é um ensaio espectrofotométrico baseado na redução de molibdênio (VI) a molibdênio (V) pela ação de uma substância antioxidante com a subsequente formação do complexo fosfato/molibdênio (V) com coloração verde [27]. A capacidade antioxidante total (% TAC) foi maior em EAMP ($72,72 \pm 1,23\%$), seguido de EMMP ($67,28 \pm 5,67\%$) e EHMP ($50,30 \pm 2,69\%$). O método FRAP se baseia na redução do complexo 2,4,6-tripiridil-s-triazina (TPTZ) férrico, de $[\text{Fe}^{3+} - (\text{TPZT})_2]^{3+}$ para $[\text{Fe}^{2+} - (\text{TPZT})_2]^{2+}$, o qual apresenta coloração azul intensa em meio ácido (pH 3,6) [28]. EHMP e EAMP apresentaram baixo poder de redução do Fe^{+3} , enquanto que EMMP apresentou alto nível de sulfato de ferro.

Todos os extratos de *M. prasina* apresentaram atividade antioxidante, contudo analisando os resultados obtidos pelos quatro métodos de atividade antioxidante, verifica-se que EMMP apresentou maior capacidade de sequestro de radicais livres e poder redutor de ferro. Ao comparar os resultados do teor de fenólicos totais com a atividade antioxidante dos extratos de *M. prasina* foi possível observar que o maior conteúdo de compostos fenólicos em EMMP resultou em um aumento na atividade antioxidante. Compostos fenólicos, representados principalmente por taninos e flavonoides, destacam-se como os principais grupo de antioxidantes naturais. Eles agem como sequestradores eficientes de radicais livres, doar átomos de hidrogênios ou elétrons ou quelar cátions de metais. Estas características desempenham papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo [37, 38].

Atividade hepatoprotetora contra intoxicação com acetaminofeno

Para avaliar a atividade hepatoprotetora de *M. prasina* foi escolhido o extrato com melhor atividade antioxidante. Os dados na Tabela 3 mostraram que 12 h após a administração de acetaminofeno camundongos desenvolveram dano hepatocelular observado pelo aumento significativo nas atividades séricas de ALT, AST e ALF quando comparado com o grupo controle positivo. A elevação dos níveis séricos de transaminases (AST e ALT) e ALP são indicadores de dano hepático, uma vez que estas estão normalmente localizadas no citoplasma e são liberadas na circulação após lesão celular [39].

O pré-tratamento com EMMP (30, 100 e 300 mg/kg) não reduziu os níveis séricos de ALT, AST e ALF em comparação com o grupo de controle negativo. A silimarina (200 mg/kg) reduziu os níveis das enzimas hepáticas indicando efeito hepatoprotetor. O grupo EMMP satélite apresentou níveis de enzimas hepáticas semelhante aos níveis do grupo controle salina. Estes resultados

comprovam que o extrato metanólico não induziu toxicidade quando administrado por 7 dias na dose de 300 mg/kg.

Durante a biotransformação do fármaco nos hepatócitos, os radicais livres são gerados continuamente. Estas moléculas instáveis reagem rapidamente com moléculas, acarretando na peroxidação lipídica, oxidação de proteínas, rupturas de cadeias de DNA e modulação da expressão gênica[40]. Evidências experimentais mostram que esses radicais livres estão envolvidos em doenças hepáticas e também levar a aterosclerose, câncer, acidente vascular cerebral, asma e artrite [41, 42].

Plantas são fontes ricas em moléculas com potencial de neutralizar os radicais livres e inibir a sua geração. É um fato bem estabelecido que o mecanismo hepatoprotetor de certos fármacos está relacionado com a sua capacidade antioxidante na eliminação de radicais livres e espécies reativas de oxigênio [43].

Tabela 3 - Efeitos de EMMP sobre enzimas hepáticas na hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno.

Grupos	Dose (mg/kg)	AST (U/L)	ALT (U/L)	ALF (U/L)
Controle negativo	-	238,2 ± 15,20	118,0 ± 16,23	238,4 ± 26,49
Controle salina	-	116,0 ± 12,57****	61,2 ± 4,54****	153,8 ± 13,7****
EMMP	30	231,2 ± 38,54	104,7 ± 9,24	221,6 ± 35,43
	100	218,6 ± 26,46	100,5 ± 7,89	233,3 ± 22,59
	300	226,0 ± 6,52	104,5 ± 6,35	230,4 ± 20,01
Satélite	300	125,5 ± 14,69****#	54,5 ± 4,18****#	157,2 ± 12,97****#
Silimarina	200	180,3 ± 17,04**	90,0 ± 6,63****	182,6 ± 12,88*

Dados representam média ± DP níveis séricos de enzimas hepáticas 12 h após a indução de toxicidade por acetaminofeno (250 mg/kg). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase e fosfatase alcalina (ALF). (N=6); *** P <0,0001; ****P<0,0001 v.s controle negativo. # - não significativo v.s controle salina. ANOVA uma via seguido do teste de Bonferroni.

A análise histopatológica do fígado nos grupos controle salina e EMMP satélite apresentou arquitetura hepática normal com células hepáticas distintas, espaços sinusoidais e veia central normais (Figuras 1A e 1B). O grupo controle negativo intoxicado com acetaminofeno apresentou alterações histopatológicas severas, como necrose hepática centrilobular, vacuolização citoplasmática, núcleo picnótico, estreitamento de capilares sinusoidais e arquitetura dos hepatócitos desorganizada (Figura

1C). EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg não evitou estas alterações histopatológicas associadas à hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno (Figura 1E e 1F).

O pré-tratamento com silimarina (200 mg/kg) preservou a arquitetura normal dos hepatócitos e reduziu os sinais de danos hepáticos (Figura 1D). Silimarina é o nome genérico de um grupo de compostos naturais (silibina, silidianina e silicristina) extraída do fruto e sementes de *Silybum marianum* com utilizado no manejo da doença hepática e falhas hepáticas induzidas por toxina [44].

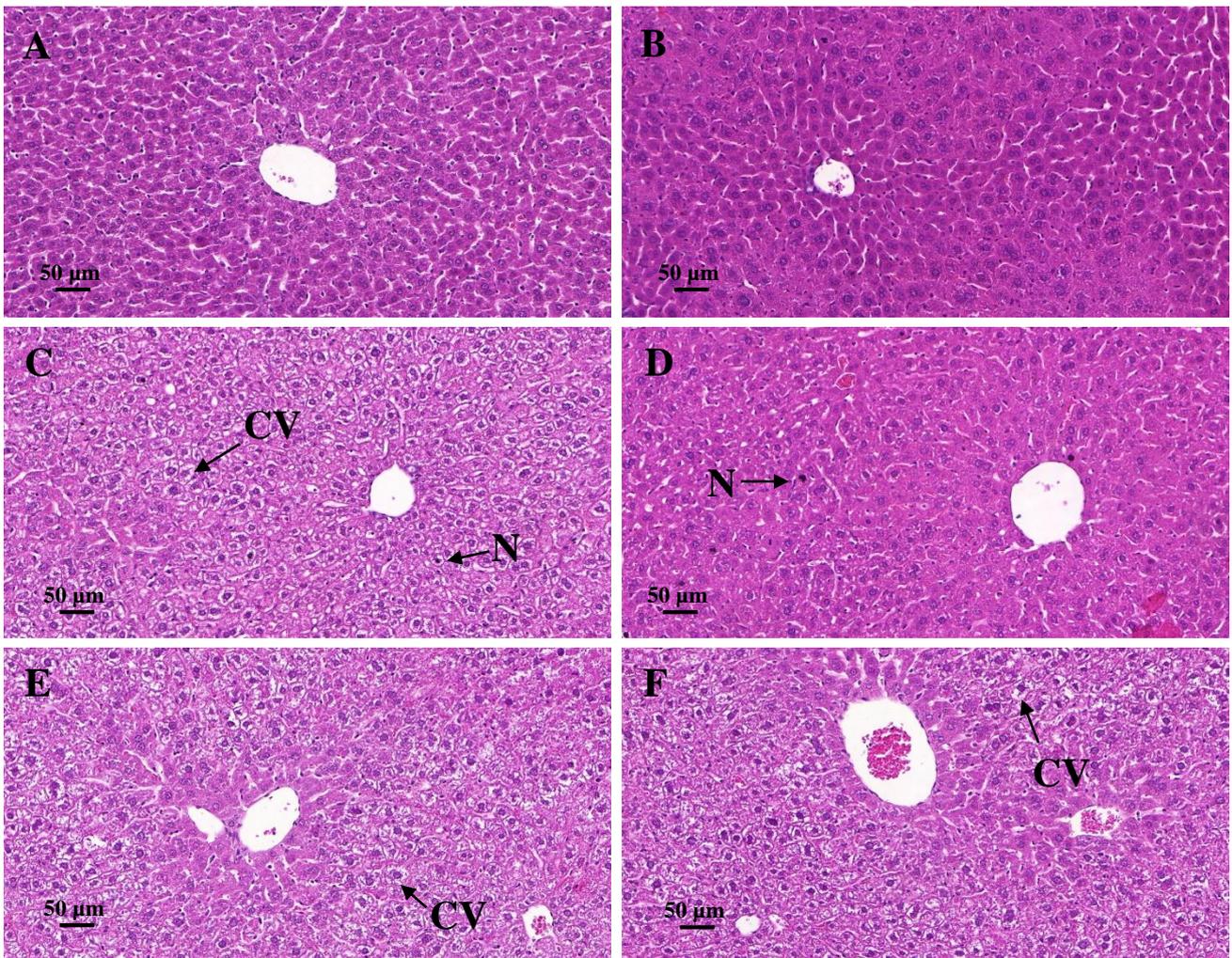


Figura 1 - Fotomicrografia hepática de camundongos submetidos a intoxicação com acetaminofeno (250 mg/kg), HE, 20X. (A) Controle salina; (B) EMMP satélite; (C) Controle negativo; (D) Silimarina 200 mg/kg; (E) EMMP 100 mg/kg; (F) EMMP 300 mg/kg. CV: vacuolização citoplasmática; N: núcleo com picnose.

A hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno ocorre através de uma reação de biotransformação que forma o metabolito reativo N-acetil-p-benzoquinonaimina (NAPQI) através da ativação do citocromo P450 do sistema oxidase. O metabolito é normalmente desintoxicado através de uma reação de conjugação com a glutathiona reduzida (GSH). No entanto, em altas doses de acetaminofeno, os níveis de NAPQI aumentam esgotando os níveis de GSH. Posteriormente, os grupos sulfidriilo de proteínas hepáticas podem reagir com o metabolito reativo, resultando em necrose hepática [45, 46]. A degeneração hepatocelular e a necrose também estão associadas a

marcadores enzimáticos elevados, como alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), que indicam hepatotoxicidade [47].

Os extratos brutos são compostos por uma variedade de compostos que podem afetar os sistemas biológicos através de interações com múltiplos alvos celulares. Estes compostos podem apresentar sinergismo, aumentando o efeito farmacológico. No entanto, a mistura de diferentes compostos também pode levar a efeitos inibitórios, onde um componente pode reduzir a atividade biológica do outro [48]. EMMP mostrou atividade antioxidante *in vitro*, no entanto, não impediu a hepatotoxicidade induzida por acetaminofeno. Os resultados sugerem que EMMP tem componentes antagonistas que reverteram os efeitos antioxidantes no modelo *in vivo*. Contudo, devem ser realizados estudos adicionais para identificar o composto ativo responsável pela atividade antioxidante de EMMP.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo indicam que os extratos de *Miconia prasina* apresentaram capacidade de eliminação radical e altos níveis de fenóis, taninos, flavonóides e cumarina. No entanto, EMMP não protegeu o fígado contra os efeitos tóxicos causados pelo paracetamol. Mais estudos são necessários para determinar o composto bioativo responsável pelo efeito antioxidante dos extratos.

Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm interesses concorrentes.

Contribuições dos autores

A avaliação dos metabolitos secundários foi realizada por AJCC e ELCA. A atividade antioxidante foi realizada por NERS e MACL. A atividade hepatoprotetora foi realizada por IVGAB e PPMN. A análise histológica foi realizada por MANS e JRCV. A análise e elaboração do manuscrito foram realizadas pela TBO e TGS.

REFERÊNCIAS

1. Starr S, Hand H: **Nursing care of chronic and acute liver failure**. Nurs Stand 2002, 16:47–54.
2. Arhoghro EM, Ekpo KE, Anosike EO, Ibeh GO: **Effect of aqueous extract of bitter leaf (*Vernonia amygdalina* Del) on carbon tetrachloride (CCl₄) induced liver damage in albino Wistar rat's**. Eur J Sci Res 2009, 26:122–130.
3. Frayn KN, Arner P, Yki-Järvinen H: **Fatty acid metabolism in adipose tissue, muscle and liver in health and disease**. Essays Biochem. 2006; 42:89–103.

4. Miller LL, Bly CG, Watson ML, Bale WF: **The dominant role of the liver in plasma protein synthesis, a direct study of the isolated perfused rat liver with the aid of lysine- ϵ -C14.** J Exp Med. 1951; 94:431–53.
5. Farrar Jr WE, Corwin LM: **The essential role of the liver in detoxification of endotoxin.** Ann N Y Acad Sci. 1966;133:668–84.
6. Poli G: **Liver damage due to free radicals.** Oxford J Med. 1993; 49:604–20.
7. Prescott LF: **Paracetamol overdose.** Drugs. 1983;25:290–314.
8. Bhanwra S, Singh J, Khosla P: **Effect of *Azadirachta indica* (neem) leaf aqueous extract on paracetamol-induced liver damage in rats.** Indian J Physiol Pharmacol. 2000; 44:64–8.
9. Bullon P, Newman HN, Battino M: **Obesity, diabetes mellitus, atherosclerosis and chronic periodontitis: a shared pathology via oxidative stress and mitochondrial dysfunction?** **Periodontology.** 2014; 64:139–53.
10. Bild W, Ciobica A, Padurariu M, Bild V: **The interdependence of the reactive species of oxygen, nitrogen and carbon.** J. Physiol. Biochem. 2013; 69(1):147-154.
11. Rahal A, Kumar A, Singh V, Yadav B, Tiwari R, Chakraborty S, Dhama K: **Oxidative Stress, Prooxidants, and Antioxidants: The Interplay.** BioMed. Res. Int. 2014; 2014:1-19.
12. Rajendran P, Nandakumar N, Rengarajan T, Palaniswami R, Gnanadhas EN, Lakshminarasiah U, Gopas J, Nishigaki I: **Antioxidants and human diseases.** Clin. Chim. Acta. 2014; 436:332-347.
13. Ezhilarasan D, Sokal E, Karthikeyan S, Najimi M: **Plant derived antioxidants and antifibrotic drugs: past, present and future.** J. Coastal Life Med. 2014; 2(9):738-45.
14. Barreiros ALBS, David JM, David JP: **Oxidative stress: relations between the formation of reactive species and the organism's defense.** Quim. Nova. 2006; 29(1):113-23.
15. Nono RN, Barboni RB, Teponno L, Bramucci M, Vitali LA, Petrelli D, Lupidi G, Tapondjou AL: **Antimicrobial, antioxidante, anti-inflammatory activities and phytoconstituents of extracts from the roots of *Dissotis thollonii* Cogn. (Melastomataceae).** South African Journal of Botany. 2014; 93: 19-26.
16. Mosquera OM, Corraera YM, Niño J: **Antioxidant activity of plants from Colombian flora.** Rev. Bras. Farmacog. 2009; 19(2A): 382-387.
17. Pieroni LG, Rezende FM, Ximenes VF, Dokkedal AL: **Antioxidant Activity and Total Phenols from the Methanolic Extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana Leaves.** Molecules. 2011; 16: 9439-9450.
18. Mamat SS, Kamarolzaman MFF, Yahya F, Mahmood ND, Shahril SS, Jakius KF, Mohtarrudin N, Ching SM, Susanti D, Taher M, Zakaria ZA: **Methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves exerted antioxidant and liver protective activity in rats.** Complementary and Alternative Medicine. 2013; 13: 1-12.
19. Kamisan FH, Yahya F, Ismail NA, Din SS, Mamat SS, Zabidi Z, Zainulddin WN, Mohtarrudin N, Husain H, Ahmaz Z, Zakaria ZA: **Hepatoprotective activity of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaf in rats.** J. Acunpunct. Merid. Studies. 2013; 6 (1): 52-5.
20. Harbone JB, Mabry TJ, Mabry H: **The flavonoids.** London: Chapman and Hall.1975.
21. Wagner H, Bladt S: **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas.** New York: Springer, 2001.
22. Amorim ELC, Nascimento JE, Monteiro JM, Peixoto-Sobrinho TJS, Araújo TAS, Albuquerque UP: **A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology.** Funct. Ecosyst. Communit. 2008; 2(1): 88-94.
23. Peixoto Sobrinho TJS, Silva CHTP, Nascimento JE, Monteiro JM, Albuquerque UP, Amorim ELC: **Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonóides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel.** Rev. Bras. Ciênci. Farmacêut. 2008; 44(4): 683-9.

24. Osório AC, Martins JLS: **Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco pro espectrofotometria derivada de primeira ordem.** Braz J Pharmaceut Scienc. 2004; 40(4): 481-486.
25. Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C: **Use of free radical method to evaluate antioxidant activity.** Lebensmittel Wissenschaftund Technologie. 1995; 28: 25–30.
26. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C: **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radic Biol Med. 1999; 26(9-10):1231-1237.
27. Prieto P, Pineda M, Aguilar M: **Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E.** Anal. Biochem. 1999; 269(2):337-341.
28. Benzie IFF, Strain JJ: **The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidante power: the FRAP assay.** Analyt Biochem. 1996; 239: 70-76.
29. Serna DMO, Martínez JHI: **Phenolics and Polyphenolics from Melastomataceae species.** Molecules. 2015; 20: 17818-47.
30. Crevelin EJ, Turatti ICC, Crotti AEM, Veneziani RCS, Lopes JLC, Lopes NP, Cunha WR: **Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using high-resolution gas chromatography.** Biomedical Chromatography. 2006; 20: 827-830.
31. Celotto AC, Nazario DZ, Spessoto MA, Martins CHG, Cunha WR: **Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species.** Brazilian Journal of Microbiology. 2003; 34: 339-340.
32. Macari PAT, Emerenciano VP, Ferreira ZMGS: **Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* triana através de análise por microcomputador.** Quím Nova. 1990; 13(40): 260-262.
33. Spagolla LC, Santos M M, Passos LML, Aguiar CL. **Extração alcoólica de fenólicos e flavonoides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante.** Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada. 2009; 30 (2): 187-191.
34. Tiwari P, Kumar B, Kaur M, Kaur G, Kaur H. **Phytochemical screening and extraction: A review.** Internationale Pharmaceutica Sciencia. 2011; 1(1): 98-106.
35. Floegel A, Kim D-O, Chung S-J, Koo SI, Chun OK: **Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods.** J. Food Compos. Anal. 2011; 24(7):1043-1048.
36. Schaich KM, Tian X, Xie J: **Hurdles and pitfalls in measuring antioxidant efficacy: A critical evaluation of ABTS, DPPH, and ORAC assays.** J. Funct. Foods. 2015; 14:111-125.
37. Pyrzyńska K, Biesaga M: **Analysis of phenolic acids and flavonoids in honey.** Trends in Analytical Chemistry. 2009; 28(7): 893-902.
38. Balasundram N, Sundram K, Samman S: **Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses.** Food Chem. 2006; 99: 191-203.
39. Chenoweth MB, Hake CL: **The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons.** Annual Review of Pharmacology. 1962; 2: 363-398.
40. McCord JM: **The evolution of free radicals and oxidative stress.** Am J medi Sci. 2000; 108:652–659.
41. Hikino H, Kiso Y: **Natural Products for Liver Disease.** London: Academic Press; 1988:39–42.
42. Liao KL, Yin MC: **Individual and combined antioxidant effects of seven phenolic agents in human erythrocyte membrane ghosts and phosphatidyl choline liposome systems: Importance of the partition coefficient.** J Agric Food Chem 2000; 48:2266–2270.
43. Ahmadi A, Ebrahimzadeh MA, Ahmad-Ashrafi S, Karami M, Mahdavi MR, Saravi SSS: **Hepatoprotective, antinociceptive and antioxidant activities of cimetidine, ranitidine and famotidine as histamine H2 receptor antagonists.** Fundam Clin Pharmacol. 2011; 25(1):72–79.

44. Scorticati C, Prestifilippo JP, Eizayaga FX, Castro JL, Romay S, Fernández MA, Lemberg A, Perazzo JC: **Hyperammonemia: brain oedema and blood-brain barrier alterations in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication.** *World J. Gastroenterol.* 2004; 10: 1321–1324.
45. Laskin DL, Pilaro AM: **Potential role of activated macrophages in acetaminophen hepatotoxicity. I. Isolation and characterization of activated macrophages from rat liver.** *Toxicology and Applied Pharmacology.* 1986; 86(2): 204–215.
46. Jaeschke H, Mitchell JR: **Neutrophil accumulation exacerbates acetaminophen induced liver injury.** *The FASEB Journal.* 1989; 3: articleA920.
47. Cigremis Y, Turel H, Adiguzel K: **The effects of acute acetaminophen toxicity on hepatic mRNA expression of SOD, CAT, GSH-Px, and levels of peroxynitrite, nitric oxide, reduced glutathione, and malondialdehyde in rabbit.** *Molecular and Cellular Biochemistry.* 2009; 323(1-2): 31–38.
48. Hammer KD, Hillwig ML, Solco AK, Dixon PM, Delate K, Murphy PA, Wurtele ES, Birt DF: **Inhibition of prostaglandin E2 production by anti-inflammatory Hypericum perforatum extracts and constituents in RAW 264.7 mouse macrophage cells.** *J. Agric. Food Chem.* 2007; 55: 7323–7331.

APÊNDICE C - MANUSCRITO 3
ESTUDO TOXICOLÓGICO DO EXTRATO METANÓLICO DAS FOLHAS DE *Miconia*
***prasina* (Sw.) DC. EM CAMUNDONGOS**

Tatiane B. Oliveira^{1*}, *Marllon A. N. Santana*¹, *Jéssica A. P. Barbosa*¹, *Isla V. G. A. Bastos*¹, *Pedro P. M. Neto*¹,
*Jeymesson R. C. Vieira*², *Jaciana S. Aguiar*¹, *Teresinha G. Silva*¹

¹*Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

²*Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brasil.*

Autor correspondente: Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Prof. Moraes Rêgo, s/n, Cidade Universitária, Recife/PE, Brazil.

Tel.: +55 81 21268347; fax: +55 81 21268346.

E-mail address: tatianebezerradeoliveira@gmail.com

Resumo: O gênero *Miconia* é composto por aproximadamente 1000 espécies. Para algumas delas, atividades biológicas já foram descritas, como atividades antioxidantes e anti-inflamatórias. O objetivo deste trabalho foi avaliar a toxicidade subcrônica do extrato metanólico das folhas de DC de *Miconia prasina* (Sw.) DC (Melastomataceae). A toxicidade aguda e subcrônica oral do extrato metanólico de *M. prasina* (EMMP) foi avaliada em camundongos. Na toxicidade aguda, uma única administração de EMMP (2000 mg/kg) não causou óbitos, nem alterações comportamentais e fisiológicas relevantes. No estudo subcrônico, o EMMP foi administrado por via oral diariamente durante trinta dias em camundongos nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Não foi observada mortalidade. O EMMP à 100 e 300 mg/kg reduziram os leucócitos no grupo de machos. Nos parâmetros bioquímicos, o EMMP à 100 e 300 mg/kg (ambos os sexos) aumentaram os níveis de ALT e AST séricos. A análise histológica do fígado nas doses de 100 e 300 mg/kg apresentaram arquitetura de hepatócitos desorganizados, núcleo com picnose, aumento do calibre vascular do espaço-porta, veia centrolobular e capilares sinusóides. Na histologia renal revelou que a administrados com EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg ocasionou hidropsia dos túbulos renais, aumento do glomérulo e espaço periglomerular. O baço apresentou características histológicas normais para todos os grupos testados. Em conclusão, os resultados demonstram que a administração subcrônica de EMMP apresentou baixa toxicidade, pois não induziu mortalidade nem alterações fisiológicas e morfológicas graves.

Palavra-chave: Melastomataceae, toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, leucócitos.

Conflito de interesses: Todos autores declam que não tem interesses concorrente.

Este artigo será submetido a **Revista Brasileira de Farmacognosia**.

Introdução

Plantas medicinais oferecem oportunidades ilimitadas para a descoberta de novos medicamentos. A maioria dos produtos naturais utilizados na medicina popular tem evidências científicas sólidas no que diz respeito às suas atividades biológicas. No entanto, há pouca informação sobre os possíveis efeitos de toxicidade que as plantas medicinais podem causar (Sasidharan et al., 2011, Dias e Takahashi, 1994).

Isso suscita preocupação com os potenciais efeitos tóxicos resultantes do uso a curto e longo prazos de tais plantas medicinais. Os estudos de toxicidade aguda e subcrônica de plantas utilizadas em animais ou seres humanos é uma parte crucial no desenvolvimento de produtos farmacêuticos (Ukwuani et al., 2012).

Miconia é um gênero de aproximadamente 1000 espécies (Martins et al., 1996) que ocorrem na América tropical (Judd e Skee, 1991). O gênero pertence à família pantropical Melastomataceae com mais de 166 gêneros que incluem cerca de 4.300 espécies (Renner, 1993). As infusões e extratos de *Miconia* e os compostos isolados de membros do gênero demonstraram atividades antimicrobianas (Rodrigues et al., 2008), antibióticas, antitumorais, analgésicas e antimaláricas (Harast et al., 1997, Cunha et al., 2003, Martins et al., 2003).

Investigações fitoquímicas e farmacológicas anteriores de nosso grupo de pesquisa demonstraram que o extrato metanólico de folhas de *M. prasina* possui altos níveis de compostos fenólicos e capacidade antioxidante. Além disso, os extratos de acetato de etila e metanólico apresentaram efeito anti-inflamatório, reduzindo o volume de edema da pata, a migração de polimorfonucleares e o nível de IL-1 β no exsudado do bolsão de ar (Dados não publicados). Com base no potencial farmacêutico de *M. prasina*, este estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade aguda e subcrônica em camundongos do extrato metanólico das folhas de *M. prasina*.

Materiais e métodos

Material vegetal

As folhas de *Miconia prasina* (Sw.) DC. (Melastomataceae) foram coletadas no período de março 2013 em Rio Largo, Alagoas, Brasil. A planta foi identificada pelo botânico Earl Celestino de Oliveira Chagas do Instituto do Meio Ambiental de Alagoas (IMA-AL) e uma exsicata foi depositada no herbário do IMA-AL (nº 50398).

Obtenção do extrato

As partes aéreas de *M. prasina* foram secas por 4 dias, em estufa com temperatura controlada e renovação constante de ar. A mesma foi moída em moinho de facas e extraída por maceração à temperatura ambiente com hexano por sete dias. O extrato foi filtrado e o resíduo foi submetido a extração com acetato de etila durante sete dias. Novamente, o extrato foi filtrado e o resíduo foi macerado com metanol pelo período de sete dias. Os filtrados foram rotaevaporados sob pressão reduzida para obtenção dos extratos orgânicos. Apenas o extrato metanólico foi utilizado neste estudo, visto que em estudos anteriores este extrato apresentou potencial farmacológico. O extrato metanólico foi diluído em solução salina (0,9 % NaCl).

Animais

Foram utilizados camundongos albinos swiss machos e fêmeas *Mus musculus* (25-30 g) provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 ± 2 °C e umidade do ar de 50-60 %, com ciclo claro / escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água à vontade. Antes dos experimentos, os animais foram aclimatados no ambiente do laboratório no mínimo 24 horas antes do experimento. Os animais foram mantidos em jejum 8 horas antes do início de cada experimento. Os procedimentos foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE (N° 23076.030375/2014-20).

Toxicidade aguda

Este experimento foi realizado segundo a metodologia proposta pelo Guia 423 da Organization for Economic Co-operation and Development (OECD, 2001). Grupos compostos por três camundongos fêmeas receberam via oral o veículo e o extrato metanólico de *M. prasina* (EMMP) na dose de 2000 mg/kg. Os animais foram observados pelo método de *screening* hipocrático por uma hora após a administração oral. Os parâmetros comportamentais observados foram: agitação, atividade motora, locomoção, resposta ao toque, piloereção, ptose, cianose, movimentos estereotipados, sonolência, frêmito vocal, ataxia, contorções, agressividade, convulsões, micção, defecação, diarreia (MALONE; ROBICHAUD, 1962). Durante 14 dias seguintes foram mensurados o consumo de água, ração e peso corporal. No último dia de observação, os animais foram anestesiados com Tiopental (5 mg/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para análise

hematológica e bioquímica. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, as vísceras foram observadas macroscópica e os órgãos fígado, rim e baço foram pesados para cálculo do índice dos órgãos.

Índice dos órgãos: peso dos órgãos (mg) / peso corporal (g)

Toxicidade subcrônica em camundongos

Quatro grupos de 10 camundongos (5 fêmeas e 5 machos) receberam por via oral solução salina ou EMMP nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg durante 30 dias. Os camundongos foram avaliados diariamente para o consumo de água e ração, peso corporal e mortalidade. No trigésimo dia do experimento, os animais foram anestesiados com tiopental (5 mg/kg) e o sangue foi coletado para exame hematológico e bioquímico. Para análise histopatológica, as amostras de fígado, rim e baço foram fixadas em 10% de formalina tamponada (OLIVEIRA et al., 2013).

Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Para o teste hematológico, amostras de sangue foram coletadas em tubos contendo EDTA e analisadas no contador hematológico ABX micros 60 (HORIBE médico). Para o teste bioquímico, as amostras foram coletadas em tubos com ativador de coágulos e centrifugadas a 4000 rpm durante 5 minutos. O soro obtido foi analisado no BIOPLUS 2000 utilizando kits bioquímicos Labtest para os seguintes parâmetros: glicose, proteínas totais, triglicérides, colesterol total, alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), creatinina, uréia e fosfatase alcalina (ALF).

Análise histológica

O fígado, o baço e os rins dos animais foram fixados em 10% de formalina tamponada. Após a desidratação dos tecidos com banhos sucessivos em álcool e diafanização com xilol, as peças foram incluídas em parafina. Foram colhidas fatias de 5 µm em lâminas, coradas com hematoxilina e eosina e observadas sob um microscópio óptico. As fotomicrografias foram obtidas em scanner de lâminas Panoramic Desk Scanner (3DHitech, Budapeste, Hungria) equipado com o programa Panoramic Viewer (3DHitech).

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – uma via), seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$. As análises foram feitas utilizando o programa GraphPad Prism 6.0.

Resultados e discussão

Toxicidade aguda

Os animais tratados por via oral com EMMP na dose de 2000 mg/kg não apresentaram sinais de toxicidade na primeira hora após a administração. Não houve a ocorrência de morte durante o experimento, nem mudanças nos parâmetros fisiológicos observados (Tabela 1). Os órgãos, fígado, rim e baço não mostraram alterações macroscópicas, nem no índice dos órgãos das mesmas vísceras.

Tabela 1 – Efeito tóxico da administração oral do extrato metanólico de *M. prasina*.

Grupo	Consumo diário		Peso (g)		Índice dos órgãos (mg/g)		
	Ração (g)	Água (mL)	Inicial	Final	Fígado	Rim	Baço
Controle	17,3 \pm 2,23	28,6 \pm 5,69	27,8 \pm 1,33	31,8 \pm 2,15	57,1 \pm 5,74	5,2 \pm 0,50	6,2 \pm 1,16
EMMP	17,2 \pm 3,80	30,0 \pm 4,80	28,7 \pm 1,80	31,9 \pm 2,54	62,5 \pm 4,53	5,4 \pm 0,30	6,2 \pm 1,03

Valores expressos em média \pm DP. (N = 6). ANOVA uma via, teste de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Os parâmetros hematológicos avaliados 14 dias após a administração oral de EMMP foram: glóbulos vermelhos, hemoglobina, hematócrito, plaquetas, volume celular médio, concentração média de hemoglobina corpuscular, hemoglobina corpuscular média e glóbulos brancos. Não houve alterações nos parâmetros hematológicos avaliados quando comparados ao controle (Tabela 2).

O EMMP na dose de 2000 mg/kg não alterou os parâmetros bioquímicos após 14 dias de administração (Tabela 2). A avaliação da toxicidade aguda é uma metodologia amplamente utilizada para verificar e classificar substâncias quanto à sua capacidade de causar danos e letalidade aos organismos vivos (Valadares, 2006; Zatta et al., 2009). De acordo com a metodologia empregada, o EMMP não produziu sinais de intoxicação nem alterações comportamentais, fisiológicas ou

hematológicas. O valor de LD₅₀ para administração oral destes extratos foi estimado em mais de 2000 mg/kg e poderia ser classificado como toxicidade Classe 5 (OECD, 2001).

Tabela 2 – Efeito do EMMP sobre parâmetros hematológicos e bioquímicos.

	Controle	EMMP
Parâmetros hematológicos		
Hemácias (10 ⁶ /mm ³)	7,8 ± 0,78	8,8 ± 0,72
Hemoglobina (g/dL)	12,6 ± 1,13	12,9 ± 1,02
Hematócrito (%)	36,2 ± 2,72	34,6 ± 2,84
VCM (µg)	48,5 ± 1,43	48,6 ± 1,57
HCM (pg)	15,2 ± 1,43	13,3 ± 1,15
CHCM (%)	30,8 ± 2,53	35,6 ± 3,69
Leucócitos (10 ³ /mm ³)	8,0 ± 0,55	8,8 ± 0,72
Parâmetros bioquímicos		
Glicose (mg/dL)	125,3 ± 9,71	129,2 ± 8,77
Triglicérides (mg/dL)	117,0 ± 9,05	109,0 ± 9,97
Colesterol (mg/dL)	89,0 ± 7,07	78,7 ± 9,21
Proteínas torais (g/dL)	5887 ± 218	5783 ± 267
Creatinina (mg/dL)	0,3 ± 0,01	0,3 ± 0,01
Uréia (mg/dL)	64,3 ± 8,74	53,7 ± 6,66
Fosfatase alcalina (U/L)	231,7 ± 21,73	212,7 ± 41,79
ALT (U/L)	66,5 ± 5,40	55,3 ± 5,80
AST (U/L)	128,0 ± 21,20	118,7 ± 22,90

Valores expressos em média ± D.P. (n=6). ANOVA uma via, teste de Bonferroni. HCM - Hemoglobina corpuscular média; CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM - Volume corpuscular médio; ALT - alanina aminotransferase; AST - aspartato aminotransferase; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

Toxicidade subcrônica em camundongos

As doses escolhidas para avaliação da toxicidade subcrônica foram baseadas na baixa toxicidade aguda do extrato e nos estudos anteriores realizados pelo nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). A administração oral de extrato de *M. prasina* durante 30 dias não causou mortalidade em nenhum dos grupos ao longo do período experimental. Nenhuma alteração em relação ao screening hipocrático foi observada, sendo o comportamento dos grupos tratados semelhantes ao do grupo controle. O grupo com as fêmeas tratadas com EMMP na dose de 300 mg/kg apresentou redução no consumo de ração (Figura 1), contudo o consumo de água e o ganho de peso não foram

alterados (Figura 2). Os demais grupos não apresentaram mudanças no consumo de ração e água. A toxicidade sistêmica de uma substância também pode ser avaliada por meio da redução nos consumos de água e ração, em conjunto com as alterações no peso corporal, alterações comportamentais, má condição de pelagem e apatia (ROCHA et al., 2012; GONZÁLEZ; SILVA, 2003; MELO, 2001).

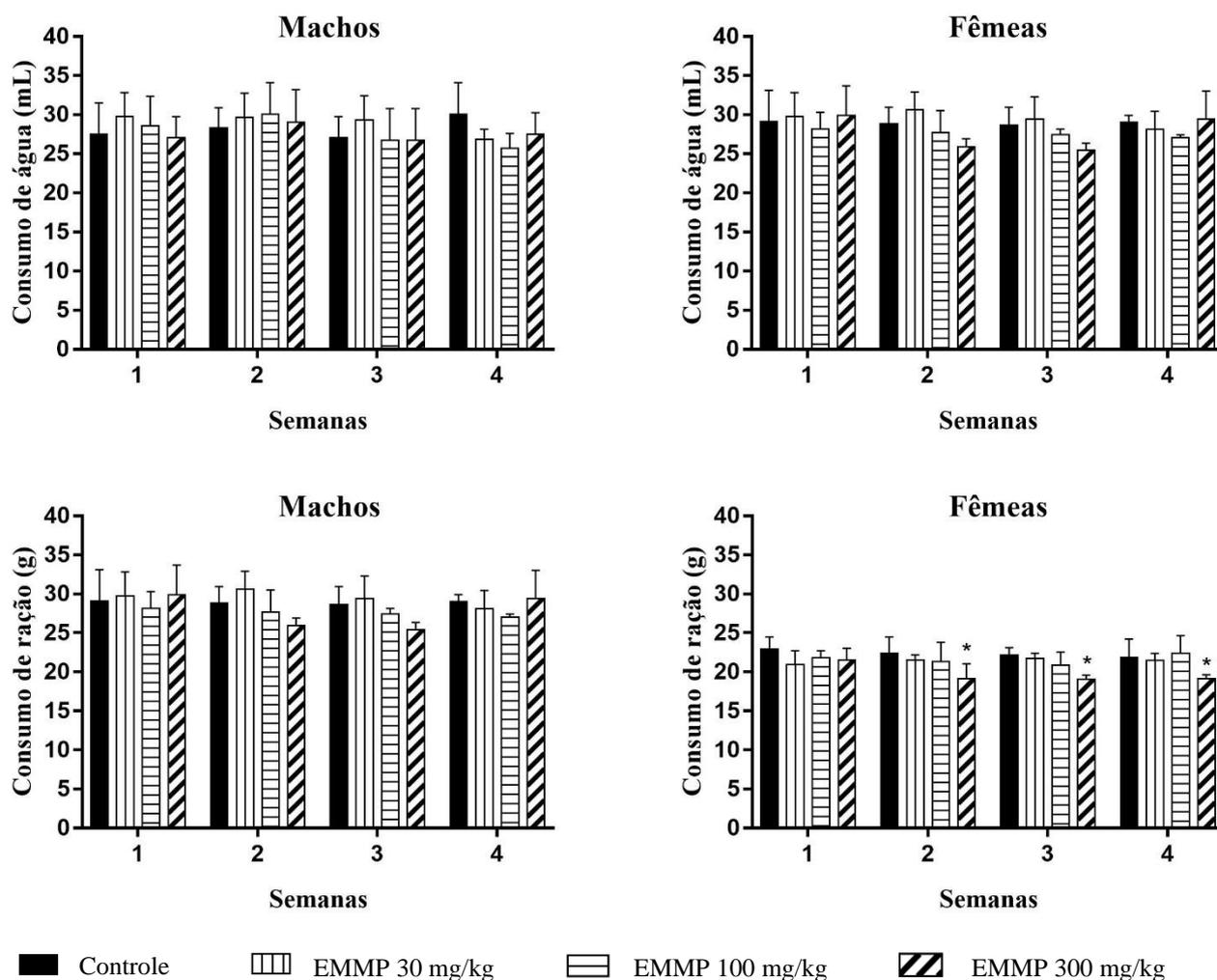


Figura 1 - Efeito da administração oral EMMP sobre o consumo de ração e água. Os valores são expressos como a média do consumo de ração e água \pm DP. * $p < 0,05$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A administração de EMMP não alterou os parâmetros hematológicos avaliados, exceto para os grupos nas doses de 100 e 300 mg/kg que reduziram o número de leucócitos na circulação sanguínea de camundongos machos (Tabela 3). Os leucócitos são células produzidas na medula óssea que participam ativamente do sistema imunológico humano, auxiliando na defesa do corpo na luta contra invasores (Vogado et al., 2016). Embora o EMMP tenha reduzido o número de leucócitos na corrente sanguínea, essa redução não foi acentuada, portanto, isso não representa um alto risco para a saúde, no entanto níveis muito baixos de leucócitos podem levar a uma maior propensão para as infecções.

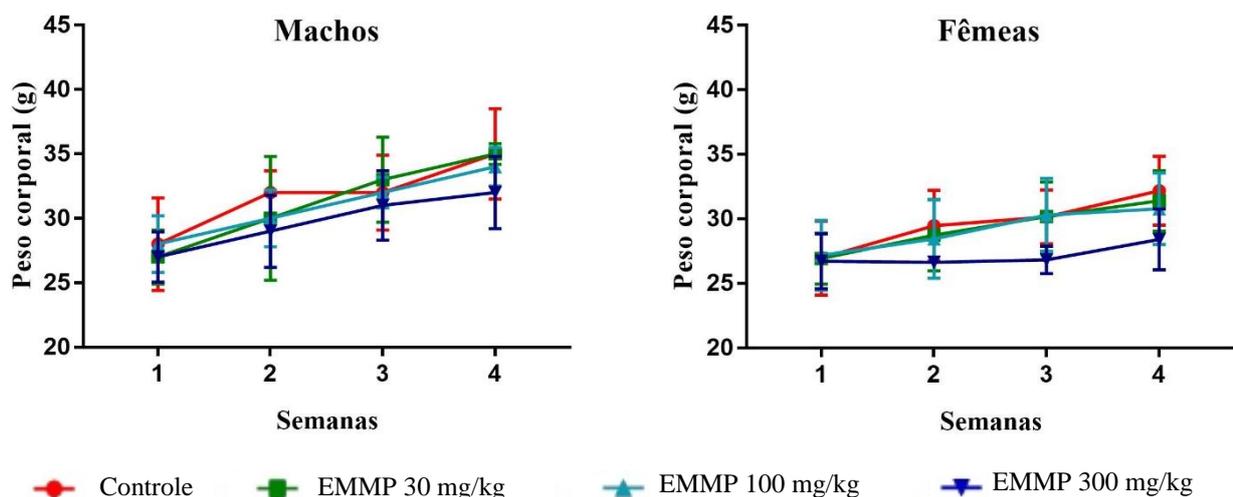


Figura 2 - Peso corporal médio de camundongos machos e fêmeas administrados com EMMP durante 30 dias. Os valores são expressos como a média do peso corporal para a semana \pm DP (n = 5). ANOVA uma via seguido pelo testes de Bonferroni. EMMP: Extrato metanólico de *Miconia prasina*.

Tabela 3 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros hematológicos.

	Controle		EMMP	
			30 mg/kg	100 mg/kg
Machos				
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,0 \pm 0,96	9,3 \pm 0,54	8,7 \pm 0,62	8,0 \pm 0,52
Hemoglobina (g/dL)	13,1 \pm 0,71	14,1 \pm 0,70	13,2 \pm 1,01	12,6 \pm 0,55
Hematócrito (%)	42,8 \pm 2,57	46,1 \pm 2,49	43,5 \pm 1,32	41,1 \pm 2,36
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	681 \pm 116,51	658 \pm 102,81	607 \pm 74,70	739 \pm 59,00
VCM (μg)	52,5 \pm 2,64	49,6 \pm 1,14	51,2 \pm 2,52	51,2 \pm 2,22
HCM (pg)	15,7 \pm 0,92	15,2 \pm 0,53	16,7 \pm 1,80	15,7 \pm 0,49
CHCM (%)	32,4 \pm 3,61	30,7 \pm 0,76	32,6 \pm 1,75	30,6 \pm 0,70
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,9 \pm 0,92	7,0 \pm 0,78	5,1 \pm 0,91***	4,7 \pm 0,92****
Fêmeas				
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8,7 \pm 0,77	8,8 \pm 0,66	9,0 \pm 0,33	8,7 \pm 1,38
Hemoglobina (g/dL)	13,6 \pm 0,88	13,6 \pm 0,91	13,8 \pm 1,12	14,4 \pm 0,22
Hematócrito (%)	43,7 \pm 4,43	44,1 \pm 3,77	46,3 \pm 0,81	38,9 \pm 4,38
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	795 \pm 17,79	798 \pm 49,50	742 \pm 44,55	684 \pm 61,04
VCM (μg)	50,2 \pm 1,10	50,0 \pm 1,58	51,3 \pm 1,15	53,0 \pm 1,41
HCM (pg)	15,6 \pm 0,52	15,6 \pm 0,90	15,9 \pm 0,64	14,5 \pm 0,44
CHCM (%)	31,3 \pm 1,26	31,7 \pm 1,84	31,2 \pm 0,55	29,3 \pm 2,62
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	7,3 \pm 0,85	6,0 \pm 1,78	6,2 \pm 0,61	6,3 \pm 1,26

Valores expressos em média \pm D.P. (n=5). *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ v.s Controle. ANOVA uma via seguido pelo teste de Bonferroni. HCM: Hemoglobina corpuscular média; CHCM: Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM: Volume corpuscular médio; EMMP: Extrato metanólico de *Miconia prasina*.

A avaliação bioquímica sérica fornece informações importantes sobre alterações no metabolismo de macromoléculas, sendo amplamente utilizados como indicadores ou marcadores de dano hepático e de sobrecarga renal (Chenoweth; Hake, 1962). A análise bioquímica revelou que nenhum dos parâmetros avaliados foram alterados pela administração de EMMP (Tabela 4).

Tabela 4 – Efeito da administração subcrônica de EMMP sobre parâmetros bioquímicos.

Machos	Controle		EMMP	
		30 mg/kg	100 mg/kg	300 mg/kg
Glicose (mg/dL)	148,5 ± 15,93	127,0 ± 18,92	133,5 ± 16,36	153,7 ± 13,63
Triglicérides (mg/dL)	153,0 ± 17,33	155,8 ± 11,41	153,7 ± 6,13	140,8 ± 23,02
Colesterol (mg/dL)	82,2 ± 6,34	84,5 ± 10,44	83,3 ± 6,97	85,3 ± 10,98
Proteínas torais (g/dL)	5803 ± 282	5887 ± 619	5892 ± 208	6047 ± 240
Creatinina (mg/dL)	0,33 ± 0,05	0,24 ± 0,05	0,25 ± 0,05	0,28 ± 0,04
Uréia (mg/dL)	74,0 ± 3,67	68,0 ± 4,97	69,3 ± 2,94	68,57 ± 6,02
Fosfatase alcalina (U/L)	213,0 ± 26,34	207,0 ± 38,10	209,0 ± 28,80	205,2 ± 19,49
ALT (U/L)	71,3 ± 2,89	68,5 ± 7,70	76,7 ± 6,29	71,2 ± 4,38
AST (U/L)	115,0 ± 6,12	129,6 ± 18,70	130,5 ± 11,27	135,0 ± 13,79
Fêmeas				
Glicose (mg/dL)	136,5 ± 17,63	120,6 ± 19,27	146,2 ± 15,32	129,4 ± 7,09
Triglicérides (mg/dL)	108,3 ± 14,61	106,0 ± 12,71	110,6 ± 11,91	107,4 ± 12,09
Colesterol (mg/dL)	67,6 ± 6,54	69,3 ± 4,72	69,6 ± 3,97	67,8 ± 12,03
Proteínas torais (g/dL)	5352 ± 283	5484 ± 389	5617 ± 349	5381 ± 282
Creatinina (mg/dL)	0,24 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,27 ± 0,05	0,26 ± 0,05
Uréia (mg/dL)	68,3 ± 3,50	63,0 ± 6,48	67,2 ± 6,30	67,2 ± 5,31
Fosfatase alcalina (U/L)	190,7 ± 37,21	181,8 ± 20,40	200,7 ± 41,42	213,0 ± 10,07
ALT (U/L)	58,2 ± 9,34	55,5 ± 7,80	62,6 ± 7,60	62,2 ± 6,53
AST (U/L)	127,2 ± 8,00	130,5 ± 17,89	129,2 ± 12,31	151,33 ± 5,51

Valores expressos em média ± D.P. (n=5). ANOVA uma via seguido pelo testes de Bonferroni. ALT: alanina aminotransferase; AST: aspartato aminotransferase; EMMP: Extrato metanólico de *M. prasina*.

A análise histológica foi realizada para identificar possíveis alterações microscópicas no fígado, rim e baço. Os grupos controles fêmeas e machos apresentaram estrutura hepática conservada, sem alterações vasculares no espaço-porta, veia centrolobular e capilares sinusóides (Figura 3A e 3E). Os camundongos de ambos os sexos administrados com o EMMP na dose de 30 mg/kg apresentaram hepatócitos preservados, com veia centrolobular, espaço-porta e capilares sinusóides sem alterações (Figura 3B e 3F). Nos grupos tratados com EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg

observou-se a arquitetura dos hepatócitos desorganizada, núcleo com picnose, aumento do calibre vascular do espaço-porta, veia centrolobular e capilares sinusóides (Figura 3C e 3G; 3D e 3H).

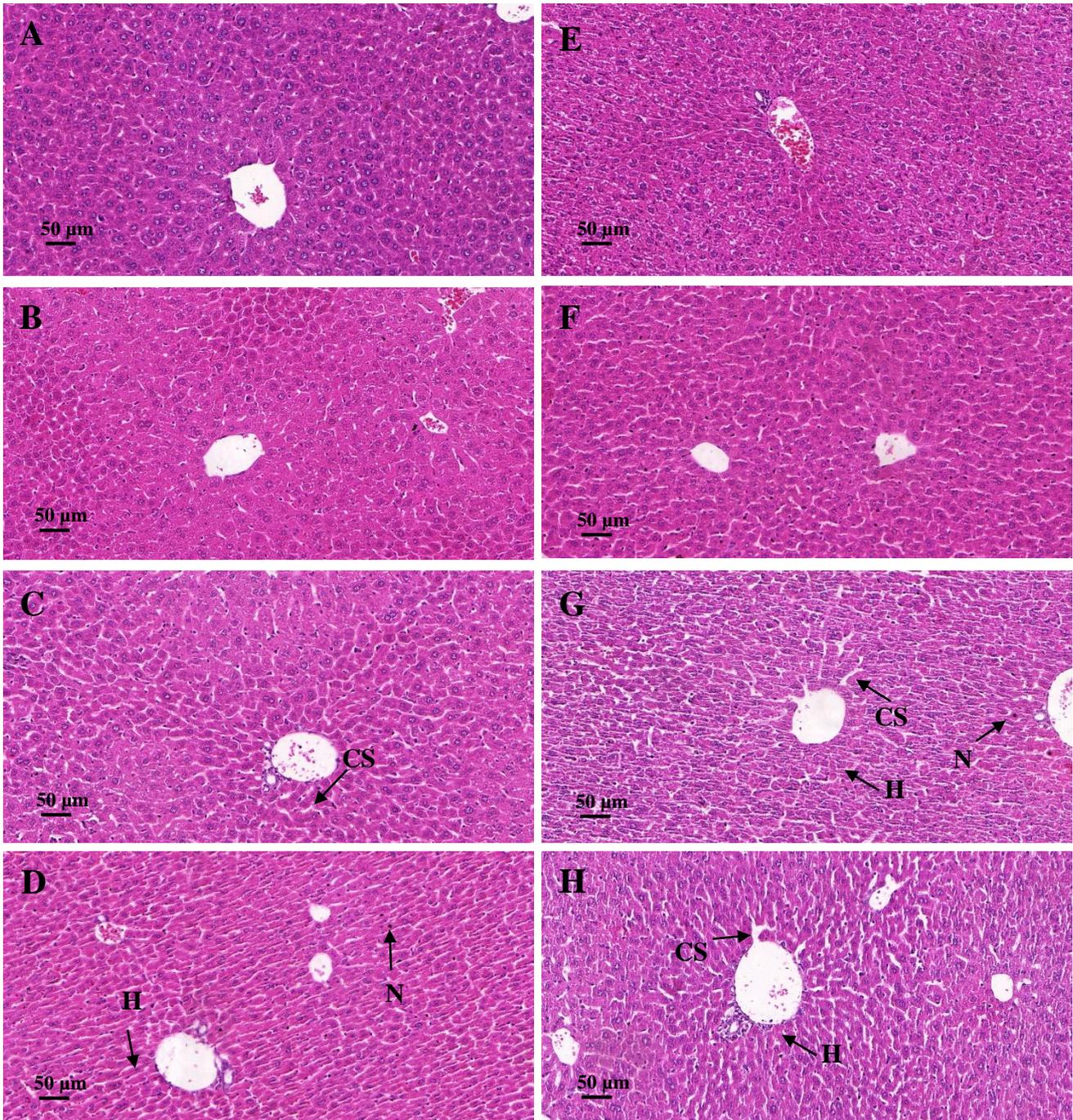


Figura 3 - Fotomicrografia hepática de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) administrados com o extrato metanólico de folhas de *M. prasina* durante 30 dias, HE, 20X. Controle (A e E); EMMP 30 mg/kg (B e F); EMMP 100 mg/kg (C e G); EMMP 300 mg/kg (D e H). CS: capilares sinusoidais com aumento do calibre vascular; N: núcleo com picnose; H: arquitetura do hepatócito desorganizada; EMMP: extrato metanólico de *Miconia prasina*.

O fígado tem a função de manter a homeostasia metabólica do corpo, sendo um dos órgãos mais afetados por lesões provocadas por agentes químicos devido a sua importante participação na biotransformação de substâncias no organismo (Schinoni, 2006). Apesar das alterações estruturais

presentes nas amostras microscópicas, estas modificações não foram acompanhada de alterações nos níveis séricos de ALT e AST, indicando que a administração subcrônica do EMMP não causou danos hepáticos graves.

Em relação aos rins, os grupos controles fêmeas e machos apresentaram estrutura renal preservada, sem alterações nos glomérulos, no espaço periglomerular e túbulos renais (Figura 4A e 4E). O EMMP na dose de 30 mg/kg apresentou glomérulos e túbulos renais conservados, com redução do espaço periglomerular (Figura 4B e 4F).

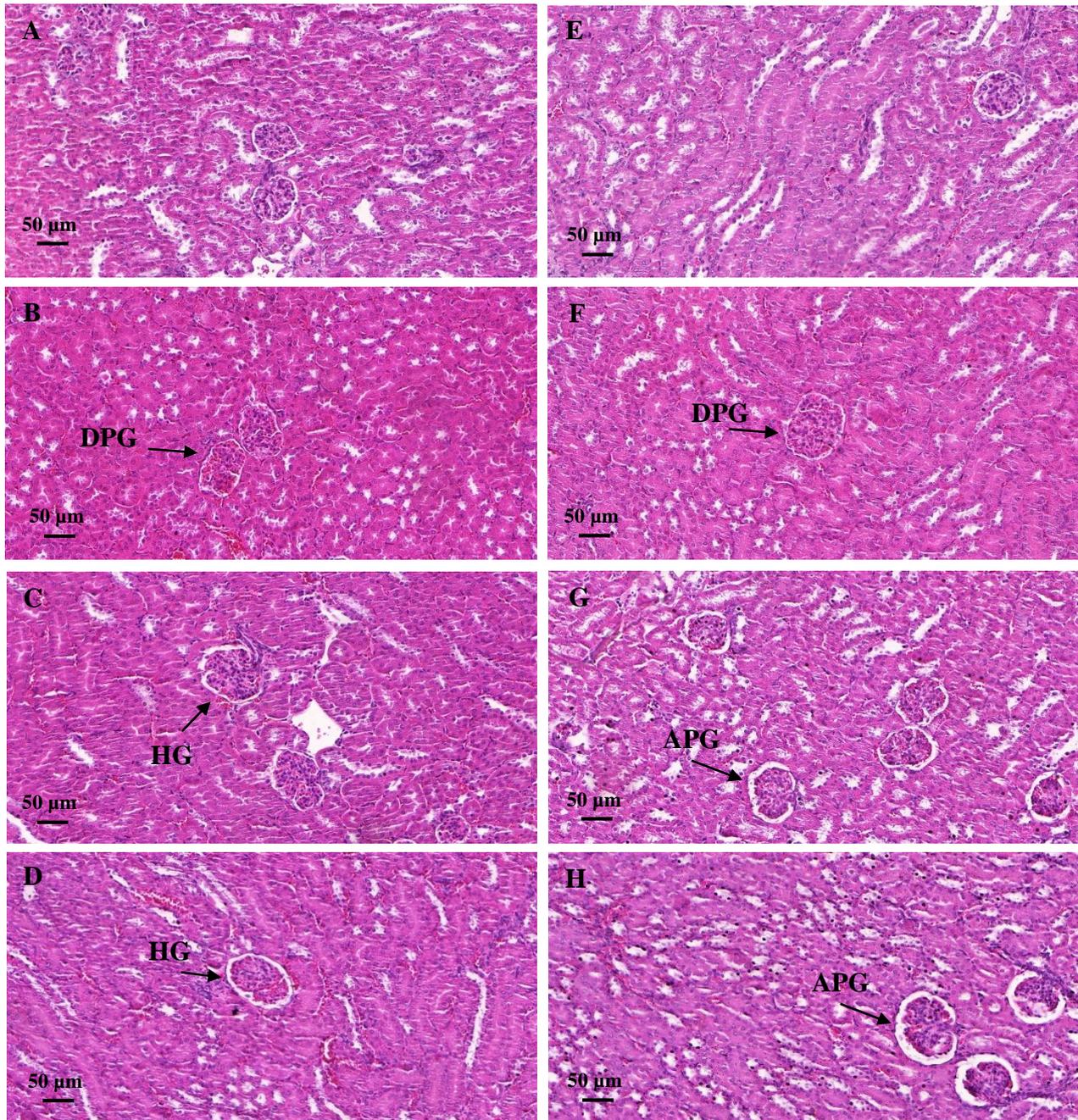


Figura 4 - Fotomicrografia renal de camundongos machos (A-D) e fêmeas (E-H) administrados com extrato metanólico de folhas de *M. prasina* por 30 dias, HE, 20X. Controle (A e E); EMMP 30 mg / kg (B e F); EMMP 100 mg / kg (C e G); EMMP 300 mg / kg (D e H). **DPG**: redução do espaço periglomerular; **APG**: aumento do espaço periglomerular; **HG**: aumento de glomérulos; EMMP: extrato metanólico de *Miconia prasina*.

Nos camundongos machos e fêmeas administrados com EMMP nas doses de 100 e 300 mg/kg foram observados hidropsia dos túbulos renais, aumento do glomérulo e espaço periglomerular (Figura 4C, 4D, 4G e 4H).

Os rins exercem múltiplas funções que podem ser caracterizadas como filtração, reabsorção, homeostase, funções endócrina e metabólica. A função primordial dos rins é a manutenção da homeostasia, regulando o meio interno pela reabsorção de substâncias e íons filtrados nos glomérulos renais e excreção de outras substâncias. Os níveis séricos de creatinina e uréia são utilizados na clínica como indicadores da função renal (Sodré; Costa; Lima, 2007). Apesar de não ter sido observado alteração nos níveis séricos creatinina e uréia, foi possível constatar na análise histopatológica alterações nos glomérulos e túbulos renais. Estes resultados indicam que a administração subcrônica do EMMP induz uma baixa toxicidade renal. Os níveis normais de creatinina sérica e uréia observados neste estudo foram consistentes com as alterações renais mínimas observadas.

O baço, o maior órgão linfóide do corpo, desempenha funções imunológicas relevantes, tais como depuração de bactérias da corrente sanguínea, produção de linfócitos e monócitos, além da síntese de fatores do sistema complemento e imunoglobulinas, principalmente IgM (Torres et al., 2000). O baço apresentou características histológicas normais para todos os grupos testados. Não foram observadas alterações na cápsula, trabécula, polpa branca e vermelha (dados não apresentados).

Os resultados demonstram que a administração subcrônica de EMMP em geral apresentou baixa toxicidade porque não induziu mortalidade ou alterações nos parâmetros fisiológicos. Contudo, em doses de 100 e 300 mg/kg reduziu o número de células polimorfonucleares em camundongos e produziu alterações morfológicas no fígado e no rim quando administradas por via oral durante 30 dias.

Agradecimentos

Este trabalho foi apoiado pela Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) no Brasil. Os financiadores não tiveram papel no design do estudo, coleta e análise de dados, decisão de publicação ou preparação do manuscrito.

Contribuições dos autores

O TBO contribuiu na obtenção dos extratos planta, análise dos dados e elaboração do manuscrito. JAPB, IVGAB e PPMN contribuíram para o desenvolvimento dos estudos biológicos. MANS e JRCV contribuíram com a confecção das laminas histológicas e com a análise histológica. JSA e TGS projetaram o estudo, supervisionaram o trabalho de laboratório e contribuíram para a leitura crítica do manuscrito. Todos os autores leram o manuscrito final e aprovaram a submissão.

Referências

- Chenoweth, M.B., Hake, C.L., 1962. The smaller halogenated aliphatic hydrocarbons. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2, 363–398.
- Cunha, W. R., Andrade E Silva, M. L., Turatti, I. C. C., Ferreira, D. S., Betarello, H. L., 2003. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. *Rev. Bras. Farm.* 84 (2), 47-49.
- Dias, F.D.L., Takahashi, C.S., 1994. Cytogenetic evaluation of aqueous extracts of the medicinal plants *Alpinia mutans* rose (Zingerberaceae) and *Pogostemum hyneanus* benth (Labitae) on Wistar rats and *Allium cepa* (Liliaceae) root tip cells. *Braz. J. Genet.* 17, (2),175–180.
- Hasrat, J.A., Backer, J.P., Valquelin, G., Vlietinck, A.J., 1997. Medicinal plants in Suriname: screening of plants extracts for receptobinding activity. *Phytomedic.* 4, 56–65.
- Judd, W.S., Skean, J.D.J., 1991. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Bull. Florida Mus. Nat. Hist.* 36, 25–84.
- Malone, M. H., Robichaud. R. C., 1962. A hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia* 25, 23-53.
- Martins, C., Ferreira, D.S., Crotti, A.E.M., Lopes, N.P., Albuquerque, S., 2003. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. *Planta Med.* 69, 468–470.
- Martins, A.B., Semir, J., Goldenberg, R., Martins, E., 1996. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. No estado de São Paulo. *Acta Bot. Bras.* 10, 267-316.
- OECD, 2001. Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method (423). 14pp.
- Oliveira, A.C.B., Oliveira, A.P., Guimarães, A.L., Oliveira, R.A., Silva, F.S., Reis, S.A.G.B., Ribeiro, L.A.A., Almeida, J.R.G.S., 2013. Avaliação toxicológica pré-clínica do chá das folhas de *Morus nigra* L. (Moraceae). *Rev. Bras. Plant. Med.* 15 (2), 244-249.
- Renner, S.S., 1993. Phylogeny and classification of the Melastomataceae and Memecylaceae. *Nord. J. Bot.* 13, 519–540.
- Rodrigues, J., Michelin, D.C., Rinaldo, D., Zocolo, G.J., Santos, L.C., Vilegas, W., Salgado, H.R.N., 2008. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). *J. Med. Food* 11, 120–126.
- Sasidharan, S., Chen. Y., Saravanan, D., Sundram, K. M., Yoga Latha, L., 2011. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants extracts. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 8 (1), 1-10.
- Schinoni, M. I., 2006. Fisiologia hepática. *Gaz. Méd. Bahia*, 76 (1), S5-S9.
- Sodré, F. L., Costa, J.C. B., Lima, J. C. C., 2007. Avaliação da função e da lesão renal: um desafio laboratorial. *J. Bras. Patolog. Med. Laborat.* 43 (5), 329-337.
- Torres, O.J.M., Macedo, E.L., Picciani, E.R.G., Nunes, P.M.S., Costa, J. V. G., Carvalho, A. B., Junior, P. S. L., 2000. Estudo histológico da regeneração esplênica de ratos submetidos à esplenectomia subtotal. *Acta Cir. Bras.*, 15, 1-12.
- Ukwuani, A.N., Abubakar, M.G., Hassan, S.W., Agaie, B.M., 2012. Toxicological studies of hydromethanolic leaves extract of *Grewia crenata*. *Internat. J. Pharmaceut. Sci. Drug Res.* 4, 245–249.
- Valadares, M.C., 2006. Avaliação de Toxicidade Aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DL50”. *Rev. Eletr. Farm.* 3(2), 93-8.
- Vogado, L. H. S., Veras, R. M. S., Lins, J. O., 2016. Avaliação de técnicas de segmentação para leucócitos em imagens de sangue. *Rev. Sist. Comput.* 6 (1), 65-73.
- Zatta, D.T., Pimenta, F.C., Tresvenzol, L.M.F., Fiuza, T.S., Bara, M.T.F., Cunha, L.C., Pucci, L.L., Garrote, C.F.D., Oliveira, F.N.M., Paula, J.R., 2009. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da *Jacaranda decurrens*. *Latin Am. J. Pharm.*, 28(4), 485-9.

ANEXO A – PARECER FAVORÁVEL DO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br

Recife, 30 de junho 2015.

Ofício nº 65/15

Da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UFPE
Para: Profª. Teresinha Gonçalves da Silva
Departamento de Antibióticos
Universidade Federal de Pernambuco
Processo nº 23076.030375/2014-20

Os membros da Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE) avaliaram seu projeto de pesquisa intitulado “**Estudo Farmacológicos e Toxicológico de Miconia prasina**”.

Concluimos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEUA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 11.794 de 08 de outubro de 2008, que trata da questão do uso de animais para fins científicos e didáticos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais a serem realizados.

Origem dos animais: Biotério do Departamento de Antibióticos/ UFPE; Animais: Camundongo heterogêneo
Linhagem: albinos suíços; Idade: 2 meses; Peso: 25-30g; Sexo: macho(85) e fêmea (34); Nº total de animais 119 e como também, Ratos Heterogêneo; Linhagem; Wistar; Idade; 2 meses; Peso; 180-200g; Sexo; macho (25); Nº Total de Animais : 144

Atenciosamente,

Prof. Dr. Pedro V. Carelli
Presidente da CEUA / CCB - UFPE
UFPE SIAPE 1801584

ANEXO B – NORMAS DO PERIÓDICO BRITISH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH

BRITISH JOURNAL OF PHARMACEUTICAL RESEARCH

General Guideline for Authors

Type of papers

1. Original research papers:

Papers that include original empirical data that have not been published anywhere earlier (except as an abstract). Null/negative findings and replication/refutation findings are also welcome. This type of paper normally should not exceed 25 double-spaced pages of text (including references) and should not contain more than 15 figures/tables. We advise a length of 3000-6000 words (including everything).

2. Short Research Articles:

Short Research Articles (or Research Notes) are single-finding papers (or one year experiment for agricultural papers) that can be reports with one or two illustrations (figures/tables) and lab protocols. Posters from conferences or internal meetings may be summarized as Short Research Articles (or Research Notes). In many cases, some additional detail, particularly in the methods, description of the results, and/or discussion/conclusions will be required to make sure that readers (and referees) have enough information to understand the description of the work. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

3. Short communications:

Short Communications are urgent communications of important preliminary results that are very original, of high interest and likely to have a significant impact on the subject area of the journal. A Short Communication needs only to demonstrate a 'proof of principle'. Authors are encouraged to submit a Original Research Paper to the journal following their Short Communication. There is no strict page limit for a Short Communication; however, we advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

4. Review papers:

These papers will not have empirical data acquired by the authors but will include discussion of papers published and data acquired in a specific area. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

5. Minireview papers:

Minireviews are brief historical perspectives, or summaries of developments in fast-moving areas covered within the scope of the journal. They must be based on published articles; they are not outlets for unpublished data. They may address any subject within the scope of the journal. The goal of the Minireviews is to provide a concise summary of a particular field in a manner understandable to all readers. We advise a length of 3000-6000 words, (including 30-70 references plus 2-3 figures and/or tables (if required)).

6. Systematic Reviews: (Mainly for bio-medical journals)

Systematic Reviews should usually be based on medical interventions or animal model studies. We recommend that authors consult the PRISMA guidelines for reporting in Systematic Reviews. Systematic Reviews should deal with a clearly formulated question and use systematic and explicit methods to identify, select, and critically assess the relevant research. We advise a length of 5000-9000 words, (including 50-150 references plus 3-5 figures and/or tables (if required)).

7. Policy Papers:

The purpose of the policy paper is to provide a comprehensive and persuasive argument justifying the policy recommendations presented in the paper, and therefore to act as a decision-making tool and a call to action for the target audience. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

8. Commentaries / Opinion Articles:

An opinion-based article on a topical issue of broad interest which is intended to engender discussion. We advise a length of 2500-3500 words, plus 2-3 figures and/or tables, and 15-20 key references.

9. Data Notes

Data Notes are brief descriptions of scientific datasets that include details of why and how the data were created; they do not include any analyses or conclusions.

10. Study Protocols and pre-protocols: (Mainly for bio-medical journals)

SDI journals welcome protocols for any study design, including observational studies and systematic reviews. All protocols for randomised clinical trials must be registered and follow the CONSORT guidelines; ethical approval for the study must have been already granted.

Study pre-protocols (i.e. discussing provisional study designs) may also be submitted and will be clearly labelled as such when published. Study protocols for pilot and feasibility studies may also be considered.

11. Method Articles:

These articles describe a new experimental or computational method, test or procedure, and should have been well tested. This includes new study methods, substantive modifications to existing methods or innovative applications of existing methods to new models or scientific questions.

We also welcome new technical tools that facilitate the design or performance of experiments and data analysis such as software and laboratory devices, or of new technologies to assist medical treatment such as drug delivery devices. We advise a length of 3000-4000 words, plus 3-4 figures and/or tables, and 15-20 key references.

12. Data Articles (Mainly for bio-medical journals):

A dataset (or set of datasets) together with the associated methods/protocol used to create the data. No analysis of the data, results or conclusions should be included.

13. Case reports / Case studies (Mainly for bio-medical journals):

Case reports describe patient cases which are of particular interest due to their novelty and their potential message for clinical practice. While there are several types of case reports, originality and clinical implications constitute the main virtues by which case reports are judged. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677298>). Case studies are an invaluable record of the clinical practices of a profession. While case studies cannot provide specific guidance for the management of successive patients, they are a record of clinical interactions which help us to frame questions for more rigorously designed clinical studies. Case studies also provide valuable teaching material, demonstrating both classical and unusual presentations which may confront the practitioner. (Ref: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2597880/>). Abstract (not more than 250 words) of the Case reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures.

14. Clinical Practice Articles (Mainly for bio-medical journals):

A short article relating to a specific clinical problem or scenario that discusses issues relating to patient management and treatment pathways using an evidence-based approach. Clinical Practice Articles include case series (i.e. group or series of case reports involving patients who were given similar treatment), but should not be based on a single case (see Case Reports).

15. Grey literature government reports:

A special section of the journal will be dedicated to publication of (extended) abstracts of "grey literature government reports". Many governmental research institutes in Europe/world are confronted with the problem that their very good scientific reports are produced directly for governmental sponsors. Results are typically presented in reports, which are published on an institute's website only. However, scientists like to publish their work in the scientific arena, albeit that there may be little, if any, funding to support writing of the results in a scientific paper. Whereas the reports may be of very high scientific quality, they are not readily disseminated into the scientific world because they are not identified by normal literature attending systems. This then leads to very good scientific work being unnoticed by a wider audience, possible re-duplication of the work in other countries, a loss of resources, and hence to a slower progression of science. Therefore, this journal offers to publish good governmental reports in this peer-reviewed scientific journal via an abstract of the report. As such, this journal will publish (extended) abstracts of governmental reports (in English language only following a regular peer review system. Scientific excellence, open access and English language are the only prerequisites. Upon scientific acceptance of the work, the extended abstract will contain the title of the work, the authors as well as a hyperlink to the original full scientific report. In this way the scientific reports will be opened to a worldwide scientific audience and authoring scientists will get the results of their work disseminated in the scientific arena.

16. Abstracts of scientific meetings:

Abstracts of oral presentations and posters (within the scope of the journal) can be published in discussion with the academic editors. Standardised abstracts (prepared in accordance with journal guidelines) need to be in English language and will be peer-reviewed prior to publication. It is recommended to contact the editor before submitting abstracts of a scientific meeting. Normally a collection of the abstracts (minimum 10 abstracts) will be published in a special issue. Abstracts are not considered for regular issues of the journal. Publication of 'collection of abstracts of a conference, symposia, etc' requires a guest editorial board. Normally the 'Review committee / Screening committee' of the conference will form the guest editorial board. List of the guest editors also will be published in the special issue.

17. Letter to the Editor:

A letter to the editor provides a means of communication between the author of an article and the reader of a journal, allowing continued dialog about journal content to take place. Although not original research per se, a letter may provide new insight, make corrections, offer alternate theories, or request clarification about content printed in the journal. Letters to the Editor are considered for publication (subject to editing and abridgment) provided they do not contain material that has been submitted or published elsewhere. Letters in reference to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). Letters not related to a Journal article must not exceed 600 words (excluding references). A letter can have no more than eight references and one figure or table. A letter can be signed by no more than four authors. Financial associations or other possible conflicts of interest must be disclosed. This type of article will be fully peer reviewed. Publication charge will be also applicable.

Reference and more information:

1. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2647072>
2. <http://www.nejm.org/page/author-center/letter-submission>
3. <http://www.sciencemag.org/site/misc/editor.xhtml>

17. Scholarly Book Review:

The scholarly book review is considered by some to be a form of academic writing that serves to describe and critically evaluate the content, quality, meaning, and significance of a book. A well constructed book review can provide a thoughtful perspective and will be appreciated. Scholarly Book Review should be within 2000 words. Scholarly Book Review must have to be systematic and structured and proper references (2-6 numbers) should be cited during review. Scholarly Book Review must be avoided to advertise the book. Normal peer review process will be followed to ensure the academic quality of such book review. Only academically important and critical review of books will be considered for publication. There will be restrictions on numbers of such articles to be published per year.

For more information please refer below mentioned resources:

1. [How to Write a Scholarly Book Review for Publication in a Peer-Reviewed Journal](#)
2. [How to Publish a Book Review](#)
3. <http://www.journals.uchicago.edu/journals/jop/book-reviews>
4. [Book Review articles: The New England Journal of Medicine](#)

(Note:

1. Case Reports should follow the structure of Abstract, Introduction, Presentation of Case, Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables. Abstract (not more than 250 words) of the Case reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures. Other Type of papers have no word limits.
2. Review papers may have different headings of the sections and are exempted from following these suggestions.
3. Research Papers and Short Notes should follow the structure of Abstract, Introduction, Methodology, Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables.)

Submission

Online submission of manuscripts is strongly recommended. Please submit your article through **Subcentral**. Manuscripts can also be submitted as email attachment to the editorial office at submission@sciencedomain.org. After submission, a manuscript number will be communicated to the corresponding author within 48 hours.

For submission related problems or all other correspondence, please contact the editorial office at help@sciencedomain.org or admin@sciencedomain.org.

Peer-review process

To know more about [SDI Peer review process](#) and SDI General Editorial Policies, [click here](#).

Manuscript structure

The manuscript should be written in English with simple lay out. The text should be prepared in single column format. Bold face, italics, subscripts, superscripts etc. can be used.

The text, excluding the abstract, if required, can be divided into numbered sections with brief headings. Starting from introduction with section 1. subsections should be numbered (for example 2.1 (then 2.1.1, 2.1.2, 2.2, etc.), up to three levels.

(Note:

1. Case Reports should follow the structure of Abstract, Introduction, Presentation of Case, Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables. Abstract (not more than 250 words) of the Case reports should have the following sections: Aims, Presentation of Case, Discussion and Conclusion. Only Case Reports have word limits: Papers should not exceed 2000 words, 20 references or 5 figures. Other Type of papers have no word limits.
2. Review papers may have different headings of the sections and are exempted from following these suggestions.

3. Research Papers and Short Notes should follow the structure of Abstract, Introduction, Methodology, Results and Discussion, Conclusion, Acknowledgements, Competing Interests, Authors' Contributions, Consent (where applicable), Ethical approval (where applicable), and References plus figures and/or tables.)

Brief guidelines

Title Page

The title page should contain a brief title, name(s) of author(s) and their affiliations. The title should be without any abbreviations and it should enlighten the contents of the paper. All affiliations should be provided with a lower-case superscript letter just after the author's name and in front of the appropriate address.

The name of the corresponding author should be indicated along with telephone and fax numbers (with country and area code) along with full postal address and e-mail address.

Abstract

The abstract should be concise and informative. It should not exceed 300 words in length. It should briefly describe the purpose of the work, techniques and methods used, major findings with important data and conclusions. Different sub-sections, as given below, should be used. No references should be cited in this part. Generally non-standard abbreviations should not be used, if necessary they should be clearly defined in the abstract, at first use.

SAMPLE ABSTRACT:

Aims: Here clearly write the aims of this study. **Sample:** To correlate platelet count, splenic index (SI), platelet count/spleen diameter ratio and portal-systemic venous collaterals with the presence of esophageal varices in advanced liver disease to validate other screening parameters.

Study design: Mention the design of the study here.

Place and Duration of Study: **Sample:** Department of Medicine (Medical Unit IV) and Department of Radiology, Services Institute of Medical Sciences (SIMS), Services Hospital Lahore, between June 2009 and July 2010.

Methodology: Please write main points of the research methodology applied. **Sample:** We included 63 patients (40 men, 23 women; age range 18-75 years) with liver cirrhosis and portal hypertension, with or without the medical history of gastrointestinal bleeding. Clinical as well as hematological examination (platelet count) and ultrasonography (gray as well as color Doppler scale including splenic index and splenorenal/ pancreaticoduodenal collaterals) was done besides upper GI endoscopy for esophageal varices. Platelet count/spleen diameter ratio was also calculated.

Results: Kindly make sure to include relevant statistics here, such as sample sizes, response rates, P-values or Confidence Intervals. Do not just say "there were differences between the groups". **sample:** Out of 63 patients, 36 patients with small varices (F1/F2) and 27 with larger (F3) varices were detected on endoscope. Significant increase in mean splenic index from low (86.7 +/- 27.4) to high (94.7 +/- 27.7) grade varices was documented. Opposite trend was found with platelets (120.2 +/- 63.5 to 69.8 +/- 36.1) and platelets/ splenic diameter ratio (1676.7 to 824.6) declining significantly. Logistic regression showed splenic collaterals and platelets are significantly but negatively associated with esophageal varices grades.

Conclusion: Non-invasive independent predictors for screening esophageal varices may decrease medical as well as financial burden, hence improving the management of cirrhotic patients. These predictors, however, need further work to validate reliability.

Keywords

Immediately after the abstract, about 4-8 keywords should be given. Use of abbreviations should be avoided, only standard abbreviations, well known in the established area may be used, if appropriate. These keywords will be used for indexing.

Abbreviations

Non-standard abbreviations should be listed and full form of each abbreviation should be given in parentheses at first use in the text.

Introduction

Provide a factual background, clearly defined problem, proposed solution, a brief literature survey and the scope and justification of the work done.

Material and methods

Give adequate information to allow the experiment to be reproduced. Already published methods should be mentioned with references. Significant modifications of published methods and new methods should be described in detail. This section will include sub-sections. Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures.

Some guidelines for Medical papers:

Randomized controlled trials should follow the CONSORT (Consolidated Standards of Reporting Trials) guidelines (<http://www.consort-statement.org>).

Case reports, case series, cross-sectional and other observational studies should follow the STROBE (Strengthening the Reporting of Observational Studies in Epidemiology) guidelines (<http://www.strobe-statement.org>). If the detailed methods are explicitly stated in the manuscript for single case studies, STROBE may be avoided. Authors producing systematic reviews and meta-analyses should follow the PRISMA (Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses) guidelines (<http://www.prisma-statement.org>).

Results & Discussion

Results should be clearly described in a concise manner. Results for different parameters should be described under subheadings or in separate paragraph. Table or figure numbers should be mentioned in parentheses for better understanding.

The discussion should not repeat the results, but provide detailed interpretation of data. This should interpret the significance of the findings of the work. Citations should be given in support of the findings. The results and discussion part can also be described as separate, if appropriate.

Tables & Figures

Tables & figures should be placed inside the text. Tables and figures should be presented as per their appearance in the text. It is suggested that the discussion about the tables and figures should appear in the text before the appearance of the respective tables and figures. No tables or figures should be given without discussion or reference inside the text.

Tables should be explanatory enough to be understandable without any text reference. Double spacing should be maintained throughout the table, including table headings and footnotes. Table headings should be placed above the table. Footnotes should be placed below the table with superscript lowercase letters.

Each figure should have a caption. The caption should be concise and typed separately, not on the figure area. Figures should be self-explanatory. Information presented in the figure should not be repeated in the table. All symbols and abbreviations used in the illustrations should be defined clearly. Figure legends should be given below the figures.

Guideline for Reporting *P* values:

P is always italicized and capitalized.

i) Correct expression: ($P = .05$). Wrong Expression: ($P < .05$), unless $P < .001$.

ii) The *P* value should be expressed to 2 digits whether or not it is significant. If $P < .01$, it should be expressed to 3 digits.

iii) When rounding, 3 digits is acceptable if rounding would change the significance of a value (eg, $P = .049$ rounded to $.05$).

iv) Expressing *P* to more than 3 significant digits does not add useful information since precise *P* values with extreme results are sensitive to biases or departures from the statistical model.

v) Reporting actual *P* values avoids this problem of interpretation. *P* values should not be listed as not significant (NS) since, for meta-analysis, the actual values are important and not providing exact *P* values is a form of incomplete reporting.

vi) Do not use 0 before the decimal point for statistical values *P*, alpha, and beta because they cannot equal 1.

Conclusions

This should briefly state the major findings of the study.

Acknowledgements

A brief acknowledgement section may be given after the conclusion section just before the references. The acknowledgments of people who provided assistance in manuscript preparation, funding for research, etc. should be listed in this section. All sources of funding should be declared as an acknowledgement. Authors should declare the role of funding agency, if any, in the study design, collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the manuscript. If the study sponsors had no such involvement, the authors should so state.

Competing Interests

Declaration of competing interest is compulsory. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. Examples of potential conflicts of interest include employment, consultancies, honoraria, paid expert testimony, patent applications/registrations, and grants or other funding. If no such declaration has been made by the authors, SDI reserves to assume and write this sentence: "Authors have declared that no competing interests exist."

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

Authors may use the following wordings for this section: “ ‘Author A’ designed the study, performed the statistical analysis, wrote the protocol, and wrote the first draft of the manuscript. ‘Author B’ and ‘Author C’ managed the analyses of the study. ‘Author C’ managed the literature searches..... All authors read and approved the final manuscript.”

CONSENT (WHERE EVER APPLICABLE)

No manuscripts will be peer-reviewed if a statement of patient consent is not presented during submission (wherever applicable).

This section is compulsory for medical journals. Other journals may require this section if found suitable. It should provide a statement to confirm that the patient has given their informed consent for the case report to be published. Journal editorial office may ask the copies of the consent documentation at any time.

Authors may use a form from their own institution or SDI Patient Consent Form 1.0. It is preferable that authors should send this form along with the submission. But if already not sent during submission, we may request to see a copy at any stages of pre and post publication.

If the person described in the case report has died, then consent for publication must be collected from their next of kin. If the individual described in the case report is a minor, or unable to provide consent, then consent must be sought from their parents or legal guardians.

Authors may use the following wordings for this section: "All authors declare that ‘written informed consent was obtained from the patient (or other approved parties) for publication of this case report and accompanying images. A copy of the written consent is available for review by the Editorial office/Chief Editor/Editorial Board members of this journal."

ETHICAL APPROVAL (WHERE EVER APPLICABLE)

This section is compulsory for medical journals. Other journals may require this section if found suitable. If human subjects are involved, informed consent, protection of privacy, and other human rights are further criteria against which the manuscript will be judged. It should provide a statement to confirm that the authors have obtained all necessary ethical approval from suitable Institutional or State or National or International Committee. This confirms either that this study is not against the public interest, or that the release of information is allowed by legislation.

All manuscripts which deal with animal subjects must be approved by an Institutional Review Board (IRB), Ethical Committee, or an Animal Utilization Study Committee. , and this statement, and approval number, must accompany the submission. If required, author should be ready to submit a scanned copy of the IRB or Ethical Committee Approval at any stage of publication (Pre of post publication stage). The manuscript should contain information about any post-operative care and pain management for the animals.

For manuscripts involving animal experiments, Authors may use the following wordings for this section “All authors hereby declare that "Principles of laboratory animal care" (NIH publication No. 85-23, revised 1985) were followed, as well as specific national laws where applicable. All experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee”

All manuscripts which deal with the study of human subjects must be accompanied by Institutional Review Board (IRB) or Ethical Committee Approval, or the national or regional equivalent. The name of the Board or Committee giving approval and the study number assigned must accompany the submission. If required, author should be ready to submit a scanned copy of the IRB or Ethical Committee Approval at any stage of publication (Pre or post publication stage).

For manuscripts involving human experiments, Authors may use the following wordings for this section: “All authors hereby declare that all experiments have been examined and approved by the appropriate ethics committee and have therefore been performed in accordance with the ethical standards laid down in the 1964 Declaration of Helsinki.”

Reference style

References must be listed at the end of the manuscript and numbered in the order that they appear in the text. Every reference referred in the text must also present in the reference list and vice versa. In the text, citations should be indicated by the reference number in brackets [3].

Only published or accepted manuscripts should be included in the reference list. Articles submitted for publication, unpublished findings and personal communications should not be included in the reference list but may be mentioned in the text (e.g., T Nelson, Purdue University, USA, Unpublished results or personal communication). Avoid citing a “personal communication” unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication. Unpublished result which has been accepted for publication in any journal should be cited as "in press". Journal name abbreviations should be those found in the NCBI databases (Link: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

Note: All SDI journals will follow this new reference style, effective from 09 Oct, 2012.

All references should follow the following style:

Reference to a journal:

For Published paper:

1. Hilly M, Adams ML, Nelson SC. A study of digit fusion in the mouse embryo. *Clin Exp Allergy*. 2002;32(4):489-98.

Note: List the first six authors followed by et al.

Note: Use of DOI number for the full-text article is encouraged. (if available).

Note: Authors are also encouraged to add other database's unique identifier (like PUBMED ID).

For Accepted, unpublished papers.

Same as above, but "In press" appears instead of the page numbers.

1. Saha M, Adams ML, Nelson SC. Review of digit fusion in the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 2009;49(3): (In press).

Note: List the first six authors followed by et al.

Note: Use of DOI number is encouraged (if available).

Note: Authors are also encouraged to add other database's unique identifier (like PUBMED ID).

For Articles not in English

Forneau E, Bovet D. Recherches sur l'action sympathicolytique d'un nouveau dérivé du dioxane. *Arch Int Pharmacodyn*. 1933;46:178-91. French.

Reference to a book:Personal author(s)

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. *Pharmacology*. 5th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone; 2003.

Editor(s) or compiler(s) as authors

Beers MH, Porter RS, Jones TV, Kaplan JL, Berkwitz M, editors. *The Merck manual of diagnosis and therapy*. 18th ed. Whitehouse Station (NJ): Merck Research Laboratories; 2006.

Authored chapter in edited publication

Glennon RA, Dukat M. Serotonin receptors and drugs affecting serotonergic neurotransmission. In: Williams DA, Lemke TL, editors. *Foye's principles of medicinal chemistry*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2002.

Reference to Web-resource or Electronic articles.

Hugo JT, Mondal SC. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis: a conceptual framework. *Global Health*. 2006;16:4. Accessed 29 March 2012. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Anonymous. Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis: a conceptual framework. *Global Health*. 2006;16:4. Accessed 29 March 2012. Available: <http://www.globalizationandhealth.com/content/1/1/14>.

Reference to Organization as author

Diabetes Prevention Program Research Group. A study of digit fusion in the mouse embryo. *J Embryol Exp Morphol*. 2009;49(2):259–276.

Nomenclature and Units

Internationally accepted rules and the international system of units (SI) should be used. If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

For biological nomenclature, the conventions of the *International Code of Botanical Nomenclature*, the *International Code of Nomenclature of Bacteria*, and the *International Code of Zoological Nomenclature* should be followed.

Scientific names of all biological creatures (crops, plants, insects, birds, mammals, etc.) should be mentioned in parentheses at first use of their English term.

Chemical nomenclature, as laid down in the *International Union of Pure and Applied Chemistry* and the official recommendations of the *IUPAC-IUB Combined Commission on Biochemical Nomenclature* should be followed. All biocides and other organic compounds must be identified by their Geneva names when first used in the text. Active ingredients of all formulations should be likewise identified.

Math formulae

All equations referred to in the text should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. Meaning of all symbols should be given immediately after the equation at first use. Instead of root signs fractional powers should be used.

Subscripts and superscripts should be presented clearly. Variables should be presented in italics. Greek letters and non-Roman symbols should be described in the margin at their first use.

To avoid any misunderstanding zero (0) and the letter O, and one (1) and the letter I should be clearly differentiated. For simple fractions use of the solidus (/) instead of a horizontal line is recommended.

Levels of statistical significance such as: *P <0.05, **P <0.01 and ***P <0.001 do not require any further explanation.

Copyright

Submission of a manuscript clearly indicates that: the study has not been published before or is not under consideration for publication elsewhere (except as an abstract or as part of a published lecture or academic thesis); its publication is permitted by all authors and after accepted for publication it will not be submitted for publication anywhere else, in English or in any other language, without the written approval of the copyright-holder. The journal may consider manuscripts that are translations of articles originally published in another language. In this case, the consent of the journal in which the article was originally published must be obtained and the fact that the article has already been published must be made clear on submission and stated in the abstract. It is compulsory for the authors to ensure that no material submitted as part of a manuscript infringes existing copyrights, or the rights of a third party.

The copyrights of all papers published in this journal are retained by the respective authors as per the 'Creative Commons Attribution License' (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>). The author(s) should be the sole author(s) of the article and should have full authority to enter into agreement and in granting rights to SCIENCEDOMAIN *international*, which are not in breach of any other obligation. The author(s) should ensure the integrity of the paper and related works. Authors should mandatorily ensure that submission of manuscript to SCIENCEDOMAIN *international* would result into no breach of contract or of confidence or of commitment given to secrecy.

Proofs

A PDF file of proof will be sent to the corresponding author as an e-mail attachment. Authors will be asked to check any typographical or minor clerical errors in the manuscript at this stage. No other major alteration in the manuscript is allowed. After publication authors can freely access the full text of the article as well as can download and print the PDF file.

Fees and Charges

Authors are requested to visit [Publication Charge](#), [FAQ and Help](#), [Authors section](#) and [Institutional membership section](#) to have information about Publication Charge and discounts.

Submission Checklist

Kindly ensure to send the following 2 files during submission.

1. Manuscript formatted as per SDI paper template (See below for link)
2. SDI Manuscript Submission form (See below for link)

ANEXO C – NORMAS DO PERIÓDICO BMC COMPLEMENTARY AND ALTERNATIVE MEDICINE

BMC Complementary and Alternative Medicine

Research article

Criteria

Research articles should report on original primary research, but may report on systematic reviews of published research provided they adhere to the appropriate reporting guidelines which are detailed in our [editorial policies](#). Please note that non-commissioned pooled analyses of selected published research will not be considered.

Preparing your manuscript

The information below details the section headings that you should include in your manuscript and what information should be within each section.

Please note that your manuscript must include a 'Declarations' section including all of the subheadings (please see below for more information).

Title page

The title page should:

- present a title that includes, if appropriate, the study design e.g.:
 - "A versus B in the treatment of C: a randomized controlled trial", "X is a risk factor for Y: a case control study", "What is the impact of factor X on subject Y: A systematic review"
 - or for non-clinical or non-research studies a description of what the article reports
- list the full names, institutional addresses and email addresses for all authors
- if a collaboration group should be listed as an author, please list the Group name as an author. If you would like the names of the individual members of the Group to be searchable through their individual PubMed records, please include this information in the “Acknowledgements” section in accordance with the instructions below
- indicate the corresponding author

Abstract

The Abstract should not exceed 350 words. Please minimize the use of abbreviations and do not cite references in the abstract. Reports of randomized controlled trials should follow the [CONSORT](#) extension for abstracts. The abstract must include the following separate sections:

- **Background:** the context and purpose of the study
- **Methods:** how the study was performed and statistical tests used
- **Results:** the main findings
- **Conclusions:** brief summary and potential implications
- **Trial registration:** If your article reports the results of a health care intervention on human participants, it must be registered in an appropriate registry and the registration number and date of registration should be in stated in this section. If it was not registered prospectively (before enrollment of the first participant), you should include the words 'retrospectively registered'. See our [editorial policies](#) for more information on trial registration

Keywords

Three to ten keywords representing the main content of the article.

Background

The Background section should explain the background to the study, its aims, a summary of the existing literature and why this study was necessary or its contribution to the field.

Methods

The methods section should include:

- the aim, design and setting of the study
- the characteristics of participants or description of materials

- a clear description of all processes, interventions and comparisons. Generic drug names should generally be used. When proprietary brands are used in research, include the brand names in parentheses
- the type of statistical analysis used, including a power calculation if appropriate

Results

This should include the findings of the study including, if appropriate, results of statistical analysis which must be included either in the text or as tables and figures.

Discussion

This section should discuss the implications of the findings in context of existing research and highlight limitations of the study.

Conclusions

This should state clearly the main conclusions and provide an explanation of the importance and relevance of the study reported.

List of abbreviations

If abbreviations are used in the text they should be defined in the text at first use, and a list of abbreviations should be provided.

Declarations

All manuscripts must contain the following sections under the heading 'Declarations':

- Ethics approval and consent to participate
- Consent for publication
- Availability of data and material
- Competing interests
- Funding
- Authors' contributions
- Acknowledgements
- Authors' information (optional)

Please see below for details on the information to be included in these sections.

If any of the sections are not relevant to your manuscript, please include the heading and write 'Not applicable' for that section.

Ethics approval and consent to participate

Manuscripts reporting studies involving human participants, human data or human tissue must:

- include a statement on ethics approval and consent (even where the need for approval was waived)
- include the name of the ethics committee that approved the study and the committee's reference number if appropriate

Studies involving animals must include a statement on ethics approval.

See our [editorial policies](#) for more information.

If your manuscript does not report on or involve the use of any animal or human data or tissue, please state "Not applicable" in this section.

Consent for publication

If your manuscript contains any individual person's data in any form (including individual details, images or videos), consent for publication must be obtained from that person, or in the case of children, their parent or legal guardian. All presentations of case reports must have consent for publication.

You can use your institutional consent form or our [consent form](#) if you prefer. You should not send the form to us on submission, but we may request to see a copy at any stage (including after publication).

See our [editorial policies](#) for more information on consent for publication.

If your manuscript does not contain data from any individual person, please state "Not applicable" in this section.

Availability of data and materials

All manuscripts must include an 'Availability of data and materials' statement. Data availability statements should include information on where data supporting the results reported in the article

can be found including, where applicable, hyperlinks to publicly archived datasets analysed or generated during the study. By data we mean the minimal dataset that would be necessary to interpret, replicate and build upon the findings reported in the article. We recognise it is not always possible to share research data publicly, for instance when individual privacy could be compromised, and in such instances data availability should still be stated in the manuscript along with any conditions for access.

Data availability statements can take one of the following forms (or a combination of more than one if required for multiple datasets):

- The datasets generated and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS]
- The datasets used and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.
- All data generated or analysed during this study are included in this published article [and its supplementary information files].
- The datasets generated and/or analysed during the current study are not publicly available due [REASON WHY DATA ARE NOT PUBLIC] but are available from the corresponding author on reasonable request.
- Data sharing is not applicable to this article as no datasets were generated or analysed during the current study.
- The data that support the findings of this study are available from [third party name] but restrictions apply to the availability of these data, which were used under license for the current study, and so are not publicly available. Data are however available from the authors upon reasonable request and with permission of [third party name].
- Not applicable. If your manuscript does not contain any data, please state 'Not applicable' in this section.

More examples of template data availability statements, which include examples of openly available and restricted access datasets, are available [here](#).

BioMed Central also requires that authors cite any publicly available data on which the conclusions of the paper rely in the manuscript. Data citations should include a persistent identifier (such as a DOI) and should ideally be included in the reference list. Citations of datasets, when they appear in the reference list, should include the minimum information recommended by DataCite and follow journal style. Dataset identifiers including DOIs should be expressed as full URLs. For example:

Hao Z, AghaKouchak A, Nakhjiri N, Farahmand A. Global integrated drought monitoring and prediction system (GIDMaPS) data sets. figshare.

2014. <http://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.853801>

With the corresponding text in the Availability of data and materials statement:

The datasets generated during and/or analysed during the current study are available in the [NAME] repository, [PERSISTENT WEB LINK TO DATASETS].^[Reference number]

Competing interests

All financial and non-financial competing interests must be declared in this section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of competing interests. If you are unsure whether you or any of your co-authors have a competing interest please contact the editorial office.

Please use the authors initials to refer to each author's competing interests in this section.

If you do not have any competing interests, please state "The authors declare that they have no competing interests" in this section.

Funding

All sources of funding for the research reported should be declared. The role of the funding body in the design of the study and collection, analysis, and interpretation of data and in writing the manuscript should be declared.

Authors' contributions

The individual contributions of authors to the manuscript should be specified in this section.

Guidance and criteria for authorship can be found in our [editorial policies](#).

Please use initials to refer to each author's contribution in this section, for example: "FC analyzed and interpreted the patient data regarding the hematological disease and the transplant. RH performed the histological examination of the kidney, and was a major contributor in writing the manuscript. All authors read and approved the final manuscript."

Acknowledgements

Please acknowledge anyone who contributed towards the article who does not meet the criteria for authorship including anyone who provided professional writing services or materials.

Authors should obtain permission to acknowledge from all those mentioned in the Acknowledgements section.

See our [editorial policies](#) for a full explanation of acknowledgements and authorship criteria.

If you do not have anyone to acknowledge, please write "Not applicable" in this section.

Group authorship (for manuscripts involving a collaboration group): if you would like the names of the individual members of a collaboration Group to be searchable through their individual PubMed records, please ensure that the title of the collaboration Group is included on the title page and in the submission system and also include collaborating author names as the last paragraph of the "Acknowledgements" section. Please add authors in the format First Name, Middle initial(s) (optional), Last Name. You can add institution or country information for each author if you wish, but this should be consistent across all authors.

Please note that individual names may not be present in the PubMed record at the time a published article is initially included in PubMed as it takes PubMed additional time to code this information.

Authors' information

This section is optional.

You may choose to use this section to include any relevant information about the author(s) that may aid the reader's interpretation of the article, and understand the standpoint of the author(s). This may include details about the authors' qualifications, current positions they hold at institutions or societies, or any other relevant background information. Please refer to authors using their initials. Note this section should not be used to describe any competing interests.

Endnotes

Endnotes should be designated within the text using a superscript lowercase letter and all notes (along with their corresponding letter) should be included in the Endnotes section. Please format this section in a paragraph rather than a list.

References

All references, including URLs, must be numbered consecutively, in square brackets, in the order in which they are cited in the text, followed by any in tables or legends. The reference numbers must be finalized and the reference list fully formatted before submission.

Examples of the BioMed Central reference style are shown below. Please ensure that the reference style is followed precisely.

See our editorial policies for author guidance on good citation practice.

Web links and URLs: All web links and URLs, including links to the authors' own websites, should be given a reference number and included in the reference list rather than within the text of the manuscript. They should be provided in full, including both the title of the site and the URL, as well as the date the site was accessed, in the following format: The Mouse Tumor Biology Database. <http://tumor.informatics.jax.org/mtbwi/index.do>. Accessed 20 May 2013. If an author or group of authors can clearly be associated with a web link (e.g. for blogs) they should be included in the reference.

Example reference style:

Article within a journal

Smith JJ. The world of science. *Am J Sci.* 1999;36:234-5.

Article within a journal (no page numbers)

Rohrmann S, Overvad K, Bueno-de-Mesquita HB, Jakobsen MU, Egeberg R, Tjønneland A, et al.

Meat consumption and mortality - results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition. *BMC Med.* 2013;11:63.

Article within a journal by DOI

Slifka MK, Whitton JL. Clinical implications of dysregulated cytokine production. *Dig J Mol Med.* 2000; doi:10.1007/s801090000086.

Article within a journal supplement

Frumin AM, Nussbaum J, Esposito M. Functional asplenia: demonstration of splenic activity by bone marrow scan. *Blood* 1979;59 Suppl 1:26-32.

Book chapter, or an article within a book

Wyllie AH, Kerr JFR, Currie AR. Cell death: the significance of apoptosis. In: Bourne GH, Danielli JF, Jeon KW, editors. *International review of cytology*. London: Academic; 1980. p. 251-306.

OnlineFirst chapter in a series (without a volume designation but with a DOI)

Saito Y, Hyuga H. Rate equation approaches to amplification of enantiomeric excess and chiral symmetry breaking. *Top Curr Chem.* 2007. doi:10.1007/128_2006_108.

Complete book, authored

Blenkinsopp A, Paxton P. *Symptoms in the pharmacy: a guide to the management of common illness*. 3rd ed. Oxford: Blackwell Science; 1998.

Online document

Doe J. Title of subordinate document. In: *The dictionary of substances and their effects*. Royal Society of Chemistry. 1999. [http://www.rsc.org/dose/title of subordinate document](http://www.rsc.org/dose/title%20of%20subordinate%20document). Accessed 15 Jan 1999.

Online database

Healthwise Knowledgebase. *US Pharmacopeia*, Rockville. 1998. <http://www.healthwise.org>. Accessed 21 Sept 1998.

Supplementary material/private homepage

Doe J. Title of supplementary material. 2000. <http://www.privatehomepage.com>. Accessed 22 Feb 2000.

University site

Doe, J: Title of preprint. <http://www.uni-heidelberg.de/mydata.html> (1999). Accessed 25 Dec 1999.

FTP site

Doe, J: Trivial HTTP, RFC2169. <ftp://ftp.isi.edu/in-notes/rfc2169.txt> (1999). Accessed 12 Nov 1999.

Organization site

ISSN International Centre: The ISSN register. <http://www.issn.org> (2006). Accessed 20 Feb 2007.

Dataset with persistent identifier

Zheng L-Y, Guo X-S, He B, Sun L-J, Peng Y, Dong S-S, et al. Genome data from sweet and grain sorghum (*Sorghum bicolor*). *GigaScience Database*. 2011. <http://dx.doi.org/10.5524/100012>.

Figures, tables additional files

See [General formatting guidelines](#) for information on how to format figures, tables and additional files.

[Submit your manuscript in Editorial Manager](#)

ANEXO D – NORMAS DA REVISTA BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA

Instructions to authors Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy

The Revista Brasileira de Farmacognosia (Brazilian Journal of Pharmacognosy) is a periodical dedicated to the publication of original scientific work, reviews and communications in the field of Pharmacognosy (the study of biologically active natural products).

General rules

- All submitted manuscripts must not have been published. The simultaneous submission of manuscripts describing the same work to other journals is not recommended. The journal will accept contributions on the understanding that the author has obtained the necessary authority for publication. In the case of multiple authors, each author must inform the corresponding author that he/she consents to submission of the article to The Revista Brasileira de Farmacognosia.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia accepts for publication original scientific work, reviews and communication articles written only in English. The content of the text is entirely the responsibility of the author(s), and does not necessarily reflect the opinion of the Editor, Editorial Board or members of the Advisory Board.
- Manuscripts written by authors whose native language is not English should be checked by a native speaker or a professional language editing service before submission. Assistance of independent editing services can be found at <http://www.sbfagnosia.org.br/revista>. All services are paid for and arranged by the author, and the use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.
- The Revista Brasileira de Farmacognosia reserves the right to submit all received manuscripts to *ad hoc* referees, whose names will be kept confidential, and who will have the authority to decide on the pertinence for acceptance. Referees may return manuscripts to the Editor-in-Chief or Section Editors for transmission to the author(s) with suggestions for necessary alterations which are to be made to conform to the standards and editorial rules of the journal.
- All articles involving studies with humans or animals should have the approval and authorization of the Ethics Committees on Research on Human Beings or on Animals of the institutions to which the author(s) belong.
- All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name of the person identifying the biological material and the location of the voucher specimen.
- Authors should be prepared to provide documentary evidence that approval for collection was afforded from an appropriate authority in the country of collection and, if applicable, to follow the rules concerning the biodiversity rights.
- Manuscripts dealing with essential oils that contain seasonal harvest and biological activity and which explore mechanisms of action or synergism are welcome.
- The journal will not accept responsibility for research works that do not comply with the legislation of the country of residence of the author.
- We strongly recommend that authors avoid stating that the popular or traditional use of a certain herb was confirmed by pre-clinical, *in-vitro* or *in vivo* tests using animals.
- The following immediate rejection criteria apply i. the manuscript does not fall into the areas of interest of the journal;
ii. manuscripts not formatted in accordance with the standards of the journal (see Section 3);
iii. the manuscript results are preliminary;

- iv. manuscripts reporting activity data without comparison with a reference, without a positive control/appropriate control or not based on adequate statistics;
- v. the biological source (*e.g.* plant, microorganism, marine organism etc.) is not clearly identified, authenticated and documented;
- vi. experimental work on antioxidant activity of crude extracts without isolation, identification and content estimation of the active compounds;
- vii. experimental work on antimicrobial activity with crude extracts without isolation and identification of the active compounds, with large MIC values ($\mu\text{g/ml}$) for antimicrobial activity ($\geq 250 \mu\text{g/ml}$ for plant extracts and $\geq 50 \mu\text{g/ml}$ for pure compounds) and without appropriate identification of culture collections/strain designation codes;
- viii. experimental work on essential oils with only one sample of a single plant specimen with a single chromatographic analysis and without appropriate statistical analyses; without oil yield (%) and characterization and component quantification not undertaken using GC-MS-FID and analyses of the retention indices of the components not calculated using *n*-alkane homologous series together with analyses of some of the isolated natural components. Biological activity results without chemical characterization of the compounds.
- ix. too preliminary data using *in-vitro* assays will not be acceptable if (i) no information on the type of activity is given; (ii) single dose or very high concentrations (must show dose–response studies); (iii) repetition of a simple bioassay (usually one assay with replicates); (iv) lack of appropriate controls (solvents; positive or negative substances according to the study); (v) no IC₅₀ values (if applicable).
- x. manuscripts with repetition of a single bioassay for yet another extract or plant;
- xi. use of only the brine shrimp assay (*Artemia salina*) to access the toxicity of extracts;
- xii. isolation and bioassay of well-known compounds with small or no relationship to the activity, or to the medicinal use of the plant without clear justification;

xiii. manuscripts reporting pharmacological or biological activities of crude extracts without chemical and technical standardization.

- All plant, microorganism and marine organism materials used in the described research should be supported by an indication of the site (including GPS coordinates, if possible) and country of origin, the name Rules for the elaboration of contributions
- The author(s) should retain a copy (electronic and paper) of the submitted manuscript in the event of loss or damage to the original sent to the journal.
- Figures (photographs, charts, drawings etc.) and tables should be inserted close to the point at which they are discussed and numbered consecutively in Arabic numerals. The respective captions should be clear, concise, with no abbreviations and located underneath the figures. If figures are from another font, formal authorization is required.
- Tables should be numbered consecutively using Arabic numerals. Tables (numerical data) should not be closed by side lines. The respective captions must be clear, concise, with no abbreviations and located above the table. There should be an indication of the approximate position in the text where tables should be placed.
- The captions of botanical illustrations (abbreviations of anatomical descriptions) should be in accordance with the rules adopted by the journal. Please request standards by email to revista@sbfgnosia.org.br.

Text formatting and contents of the work

• **Original papers:**

Original papers are research articles describing original experimental results. The manuscript should be arranged in the following order: Title, Abstract, Keywords, Introduction, Material and Methods, Results, Discussion, Acknowledgements, Authorship, References, Figures with Legends, Tables and Structural Formulae. Results and Discussion sections may appear as a combined ‘Results and Discussion’ section. The normal length of the main text of an Original Paper (excluding references, tables, figures and figure legends) is approximately 3,000 words. Longer manuscripts may be accepted in exceptional and welljustified cases. If submitting such

manuscripts, authors should provide a justification statement in the covering letter, giving compelling reasons for the length of the paper.

• **Brief communications:**

This section will cover mainly the isolation of known compounds from new neotropical sources, or complementary results of on-going work. The text should be arranged as follows: Title, Abstract of 200 words, Keywords, Introductory Remarks, Material and Methods with brief experimental details without subheadings, Results and Discussion as one body of text without headlines, Acknowledgements, References (up to 20 citations) and Figures and/or Tables (up to 3). The text should not exceed 2,000 words.

• Reviews will, in general, be invited by the Editor-in-Chief and only those with more than 100 references will be considered. The main purpose of reviews is to provide a concise, accurate introduction to the subject matter and inform the reader critically of the latest developments in the field. They should be concise and not include experimental details.

• In addition to these Guidelines, a template (for original papers) and a sample covering letter are available at www.sbfgnosia.org.br/revista. Authors are strongly recommended to follow these formats when preparing a manuscript.

• The originals should be on A4-sized paper, double-spaced using Times New Roman size-12 font, fully justified, with margins of 2 cm.

• **Title and subtitle:**

They should be in lower case, using Times New Roman size-14 font, and in accordance with the contents of the article, taking in consideration the scope and objectives of the journal.

• **Authors:**

The authors' names should appear centred underneath the title. The first and last names should appear in full, followed by the initials of all other names (e.g. Carlos N. U. Silva). In the case of several authors, the names should be separated by commas.

• **Author affiliations:**

After each author name there should be superscript Arabic numerals indicating the institution to which they are affiliated. The list of institutions should appear immediately

below the list of authors. The name of the corresponding author should be identified with a superscript asterisk indicating the address to which all correspondence should be sent. The electronic institutional address, telephone number and fax number of the main author should appear after the References. The journal will not publish commercial e-mail addresses.

• **Abstract:**

A brief and concise abstract of ≤ 300 words highlighting the most important information (including the methodology, results and conclusions) that allows readers to evaluate their interest in the article and thus avoiding reading of the entire work.

• **Keywords:**

Very important for database searches, thus validating the article. The authors should identify a maximum of six Keywords, in alphabetical order and separated by commas, to represent the content of the article.

• **Introduction:**

The Introduction should clearly establish the objectives of the work and its relationship with other works in the same field. Extensive literature reviews should be replaced by references of more recent publications, where these reviews have been published and where they are available.

• **Materials and methods:**

The description of the Material and the Methods used should be brief and sufficiently clear for comprehension and reproducibility of the work. Processes and techniques already published, unless extensively modified, should be referenced. Plant names should be complete, including author name and family, according to <http://www.tropicos.org>, <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/> or <http://www.theplantlist.org/> or.

• **Results:**

The Results should be presented with minimum personal discussion or interpretation, and whenever possible, be accompanied by suitable tables and figures. The data, if pertinent, should be subjected to statistical analyses.

• **Discussion:**

The Discussion must be restricted to the significance of the data presented, avoiding conclusions not based upon them. Alternatively, at the discretion of the author,

the Results and Discussion can be presented as one section.

• **Acknowledgements:**

This is an optional item. Please acknowledge anyone who made a substantial contribution towards the article.

• **Author contributions:**

The role of each author involved in the development of the study and/or the elaboration of the manuscript must be clearly described, and he/she should be referred to by his/her initials. Please see the template for examples available at www.sbfgnosia.org.br/revista.

References

The formatting of the references should be standardized to conform to the requirements of the journal as outlined. Preferentially use references that can be accessed by the readers worldwide. EndnoteR users, please see the template section available at www.sbfgnosia.org.br/revista to obtain the EndnoteR style for RBFAR.

• References within the text: at the beginning of the citation: Author in lower case, followed by the publication year between parenthesis, e.g. Pereira (1999); at the end of the citation: Author in lower case and year, both between parenthesis. e.g. (Silva, 1999) or (Silva and Souza, 1998) or (Silva et al., 1999) or (Silva et al., 1995a,b); textual citation: the page must be provided, e.g. (Silva, 1999, p. 24).

• The references should be presented in alphabetical order by the last name of the first author, in lower case in ascending order of the publication date. Take into consideration the following possibilities:

• Article from a periodical: Title of the periodical in italics abbreviated conform Chemical Abstracts Service Source Index (<http://www.cas.org/sent.html> or <http://library.caltech.edu/reference/abbreviations/>). In the case of an authorised abbreviation of a certain periodical that cannot be located and is not obvious, the title should be cited complete (e.g.):

Kumar, D., Bhujbal, S.S., Deoda, R.S., Mudgade, S.C., 2010. *In-vitro* and *in-vivo* antiasthmatic studies of *Ailanthus excelsa* Roxb. on guinea pigs. J. Sci. Res. 2, 196-202.

In case the cited journal is not readily accessible, the Chemical Abstract Number can be quoted, as follows:

Qu, W., Li, J., Wang, M. 1991. Chemical studies on *Helicteres isora* L. Zhongguo Yaoke Daxue Xuebao 22, 203-206, apud Chemical Abstracts 116, 124855r.

In a citation, the sources should be shown in italics: Wax, E.T., 1977. Antimicrobial activity of Brazilian medicinal plants. J. Braz. Biol. Res. 41, 77-82, apud Nat. Prod. Abs. 23, 588-593, 1978.

• Book:

Costa, A.F., 1996. Farmacognosia. Lisboa: Calouste Gulbenkian.

• Book chapter:

El Sohly, M.A., Stanford, D.S., Murphy, T.P., 2007. Compounds properties and drug quality. In El Sohly, M.A. (org.) Forensic Science and Medicine: Marijuana and the Cannabinoids. New Jersey: Humana Press, p. 51-66.

• Thesis or dissertation materials:

Singab, A.N.B.I., 1996. Phytochemical studies of some potential bioactive Egyptian plants. Tokyo 173p. PhD Thesis, Meiji College of Pharmacy.

Romero, M.A.V., 1997. Estudo quimico de *Brunfelsia hopeana* Benth e do mecanismo de acao da escopoletina. Joao Pessoa, 119p. Dissertacao de Mestrado, Programa de Pos-graduacao em Produtos Naturais, Universidade Federal da Paraiba.

• Scientific meetings:

Oliveira, R.M.M.W., Lolli, L.F., Santos, C.A.M., 2006. Possible involvement of GABA benzodiazepine receptor in the anxiolytic-like effect induced by *Passiflora actinia* extracts in mice. 19th ECNP Congress. Paris, France.

• Patents:

Should be identified as indicated below; whenever possible the Chemical Abstracts Service number should be in-formed.

Ichikawa, M., Ogura, M., Lijima, T., 1986. Antiallergic flavones glycoside from *Kalanchoe pinnatum*. Jpn. Kokai Tokyo Koho JP 61,118,396, apud Chemical Abstracts 105, 178423q.

• Internet pages:

Taylor, L., 2000. Plant based drugs and medicines. <http://>

www.raintree.com/plantdrugs.htm, accessed Oct 2009.

Abbreviations

Units will be in accordance with the International System (SI) as adopted by the 11th General Conference on Weights and Measures. Common abbreviations to be used are m (meter); cm (centimeter); mm (millimeter); μm (micrometer); nm (nanometer); kg (kilogram); g (gram); mg (milligram); μg (microgram); ng (nanogram); ml milliliter; μl (microliter); s (second); min (minute); h (hour); N (normal); M molar; mM (millimolar); μM (micromolar); SD (standard deviation); SE (standard error); X (mean); Ci (Curie); mp (melting point); bp (boiling point); TLC (thin-layer chromatography); GC (gas chromatography); NMR (nuclear magnetic resonance); MS (mass spectrometry); UV (ultraviolet); CD (circular dichroism); IR (infrared); g instead of rpm; ppm (parts per million); cpm (counts per minute); dpm (disintegrations per minute); Hz (Hertz); LD50 (median lethal dose); LC50 (median lethal concentration); TLV (threshold limit value). When using a word that is asserted to be a proprietary term or trademark, authors must use the symbol R.

Illustrations

- The quality of the illustrations depends on the quality of the originals provided. Figures cannot be modified or enhanced by the production staff of the journal. The graphics must be submitted as part of the manuscript file. Contrast is important.
- Remove all colour from graphics, except for those graphics that author(s) would consider for publication in colour (see Costs section for details).
- Chemical structures are not considered as figures, should be numbered sequentially in bold letters according to their citations in the manuscript, and placed closed to the desired point in the manuscript body. Structures should be drawn according to the style set by the American Chemical Society. Preferences for the drawing of structures can be found as a pre-set style in appropriate software packages.
- Upload each figure in .tiff, .jpg or .eps format. The figure number and the top of the figure should be indicated. Lettering must be with Arial font of a reasonable size that will be

clearly legible upon reduction and which is consistent within each figure and set of figures. If a key to symbols is required, please include this in the figure legend.

- The journal uses recycled paper, so colour pictures are accepted and will be available only online unless the author(s) agree to cover the extra expenses for the print publication irrespective of the number of pages of the article.

Submission of manuscripts

- Manuscripts which do not meet acceptable standards will be returned to the authors.
- Manuscript submissions will be processed exclusively online at <http://mc04.manuscriptcentral.com/rbfarscielo>. Please follow carefully the guidelines for authors. Submissions by e-mail will not be accepted.
- Important: All authors, with their respective email addresses, should be entered into the system.
- The qualification of the manuscript will be certified by at least two referees indicated by the Editorial Board. Processing fee
- The journal charges nominal publication fee for articles upon acceptance to cover production cost.
- The charge is US\$ 200.00/paper when the corresponding author is a member of the Brazilian Society of Pharmacognosy and US\$ 300.00/paper for nonmembers. Articles with high scientific relevance will have reduced fee.
- A limited number of waivers for article processing charges are also available at the editors' discretion, and authors wishing to apply for these waivers should contact the editors.
- Editors and reviewers have no access to whether authors are able to pay; decisions to publish are only based on editorial criteria.

Proofs and reprints

- Galley proofs will be sent to all authors as a PDF file. Rephrasing of sentences or additions is not permitted at the page-proof stage. It is the responsibility of the corresponding author to ensure that all authors listed on the manuscript agree with the changes made on the proofs. Galley proofs should be returned within 5 days of receipt to ensure timely publication of the manuscript.