

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

TATIANE CRISTINA SILVA MAIOLINI

ATIVIDADE DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE DE
Allophylus racemosus Sw.

ALFENAS/MG

2016

TATIANE CRISTINA SILVA MAIOLINI

ATIVIDADE DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO DA ESPÉCIE DE
***Allophylus racemosus* Sw.**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Química Orgânica
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marisi Gomes Soares

Alfenas/MG

2016

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal de Alfenas

Maiolini, Tatiane Cristina Silva.
Atividade do potencial anti-inflamatório da espécie *Allophylus racemosus* Sw. / Tatiane Cristina Silva Maiolini. -- Alfenas/MG, 2016.
74 f.

Orientadora: Marisi Gomes Soares.
Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2016.
Bibliografia.

1. Anti-inflamatório. 2. Edema - Orelha. 3. Óleos Voláteis. I.
Soares, Marisi Gomes.II. Título.

CDD-547

Tatiane Cristina Silva Maiolini

**“Atividade do potencial anti-inflamatório da espécie
Allophylus racemosus Sw”**

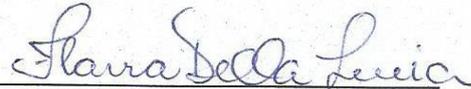
A Banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Química-Orgânica.

Aprovado em: 29/07/2016

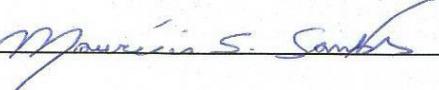
Profa. Dra. Marisi Gomes Soares
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Profa. Dra. Flávia Della Lúcia
Instituição: Universidade Federal de Alfenas –
UNIFAL-MG

Assinatura:  _____

Prof. Dr. Maurício Silva dos Santos
Instituição: Universidade Federal de Itajubá

Assinatura:  _____

AGRADECIMENTOS

Ao meu Deus que me deu a vida, força nos momentos difíceis, que é a luz que trilha meus caminhos.

Aos meus pais que sempre apoiaram e incentivaram nas minhas decisões, tenho muito orgulho de vocês. Obrigada por sempre estarem presentes, amo vocês!

Ao meu marido, Andrigo, que sempre está presente me apoiando, “me levantando” quando minhas forças parecem estar acabando. Sempre com muita compreensão e paciência, e quanta paciência. Me desculpe pelos momentos de ausência e obrigada pelos incentivos, te amo muito!!!

A minha irmã que sempre esteve presente apoiando e incentivando, principalmente em momentos de grande decisão desta jornada– prova, seminário, qualificação do mestrado (“chaveirinho da sorte”). Ao meu sobrinho lindo que sempre me dá orgulho. Amo vocês!!!

A minha orientadora, professora Dr. Marisi Gomes Soares, pela oportunidade, orientação, conhecimentos compartilhados, atenção, carinho, amizade, enfim não só pelo conhecimento científico, mas principalmente pelas sábias palavras de apoio. Tenho muito orgulho de fazer parte do seu grupo de pesquisa. Muito obrigada!

A professora Dr. Daniela Aparecida Chagas de Paula, por toda atenção, carinho, amizade, pelos conhecimentos compartilhados, pelas conversas (gosto muito da sua gargalhada).

Aos meus colegas e amigos do LFQM, não só pelos conhecimentos adquirido com cada um, mas principalmente pelos momentos de descontração, que fizeram o trabalho mais leve (principalmente na “reta final”), em especial ao Welton (só me faz rir, tosco), João (por pegar tanto no meu pé), Lais (Lalá, agradeço muito pelas palavras de carinho, sem contar os cafézinhos), Luiza (minha primeira companheira de testes), Victor (se revelou todo engraçadinho), ao Thiago (Tititi, que sempre me deu ótimos conselhos), Jaque (torna o LFQM mais divertido), Isabela (Disabeba, sempre “quietinha”, mas ótima amiga) e a Olivia (nova companheira de testes). Muito obrigada!!!

RESUMO

A natureza sempre despertou no homem um fascínio encantador, não só pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas também sua principal fonte de inspiração e aprendizado. *Allophylus racemosus* Sw., objetivo deste trabalho, não apresenta relatos de sua utilização, e tampouco quando se trata de dados científicos em bases de pesquisa sobre estudos de suas atividades farmacológicas. Esta planta pertence à família Sapindaceae que compreende cerca de 140 gêneros e 1900 espécies pelo mundo todo. Dentre eles, o gênero *Allophylus* apresenta cerca de 250 espécies. Apesar de um número considerável de espécies, há uma escassa quantidade de pesquisas relacionadas a este gênero, e tampouco dessa espécie. As folhas dessa planta foram coletadas na região da mata atlântica mineira nas proximidades do município de Alfenas-MG. Para o estudo fitoquímico e teste de atividade anti-inflamatória, o extrato bruto etanólico das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. foi obtido por maceração em etanol e submetida ao teste de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha, onde se constatou uma atividade anti-inflamatória estatisticamente significativa frente aos controles negativo e positivo (indometacina) utilizados. Em seguida realizou-se o particionamento do extrato bruto por extração líquido-líquido com hexano, acetato de etila e uma mistura etanol:água (1:2), dando origem as frações hexânica, acetato e hidroalcoólica, o que permitiu separar compostos por diferença de polaridade. Posteriormente, as três frações obtidas foram submetidas ao bioensaio, na concentração de 1mg/orelha, para determinar o grupo de maior atividade, sendo a fração hidroalcoólica a que apresentou maior atividade (43,6%). Posteriormente, as três frações obtidas foram submetidas ao bioensaio, na concentração de 1mg/orelha, para determinar o grupo de maior atividade, sendo a fração hidroalcoólica a que apresentou maior atividade (43,6%). Através desta fração, foi possível isolar (por LC-DAD utilizando uma coluna semi-preparativa) e identificar (por LC-MS) uma substância que apresenta o núcleo de uma apigenina ligada a uma pentose. Além do extrato bruto e das frações de *Allophylus racemosus* Sw. foi testada a atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais, sendo que o mesmo apresentou resultados

estatisticamente significativos frente aos controles negativo e positivo (indometacina e Acheflan®). A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais está relacionada, principalmente aos compostos majoritários, γ -muuroleno (30,66%), (*E*)-cariofileno (18,56%) e biciclogermacreno (17,38%), além do composto α -humuleno (2,33%), também encontrado no fitomedicamento Acheflan® e sendo o responsável, junto com (*E*)-cariofileno, pela atividade anti-inflamatória do fitomedicamento como relatado na literatura.

Palavras-chave: *Allophylus racemosus* Sw. Atividade anti-inflamatória. Edema de Orelha. Óleos Essenciais

ABSTRACT

The nature always aroused in man a charming allure, not only by the resources available for their food and maintenance, but also for their main source of inspiration and learning. *Allophylus racemosus* Sw., objective of study, has no reports of its use, nor when it comes to scientific research data bases on studies of their pharmacological activities. It belongs to the Family Sapindaceae that comprises 140 genus and about 1900 species worldwide. Among them the *Allophylus* genus has about 250 species. Although a considerable number of species, there is a scant amount of research related to this genre, nor that kind. This plant was collected in the region of Minas Gerais Atlantic Forest near city Alfenas-MG. For the phytochemical study and anti-inflammatory activity, the crude ethanol extract of *Allophylus racemosus* Sw. leaves were obtained by extraction in ethanol and subjected to paw edema induced by carrageenan and ear edema test, which demonstrated a statistically significant anti-inflammatory activity compared to the negative and positive controls (indomethacin). After that, the crude extract there was partitioning by liquid-liquid extraction with hexane, ethyl acetate and a mixture ethanol: water (1: 2) to give three fractions allowing separating compounds according polarity. Subsequently, the three fractions obtained were subjected to bioassay to determine the group of higher activity. The hydroalcoholic fraction presented the highest activity(43,6%). Through this fraction could be isolated (by LC-DAD using a semi-preparative column) and identifying (LC-MS) a substance that has a core apigenin linked to a pentose. In addition to the crude extract and fractions of *Allophylus racemosus* Sw. Was tested for anti-inflammatory activity of essential oils, and it showed statistically significant (24.8% and 41.3% at concentrations of 0.25% and 25%, respectively) results compared to the negative and positive controls (indomethacin and Acheflan®). The anti-inflammatory activity of the essential oils is mainly related to the major compounds, γ -muurolene (30.66%), (*E*)-caryophyllene (18.56%) and bicyclogermacrene (17.38%), and the compound α -humulene (2.33%), also found in Acheflan® phytomedicine and being responsible for along with (*E*)-caryophyllene, the anti-inflammatory activity of phytomedicine as reported in the literature.

Keywords: *Allophylus racemosus* Sw. anti-inflammatory activity. Ear Edema.
Essential oils

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	-	Compostos orgânicos isolados no século XIX.....	17
Figura 2	-	<i>A. racemosus</i> Sw. Ramo florífero.....	22
Figura 3	-	<i>A. racemosus</i> Sw. Ramo frutífero.....	22
Figura 4	-	<i>Allophylus racemosus</i> Sw. A: ramo frutífero; B: ilustração de ramo frutífero; C-F: ramos frutíferos.....	23
Figura 5	-	Distribuição geográfica de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	24
Figura 6	-	Lupeol, composto orgânico isolado de <i>Allophylus edulis</i> com atividade anti-inflamatória.....	25
Figura 7	-	Compostos orgânicos isolados de <i>Allophylus longipes</i> com atividade anti-inflamatória.....	26
Figura 8	-	Compostos orgânicos isolados de <i>Allophylus serratus</i> com atividade anti-inflamatória.....	26
Figura 9	-	Esquema representativo da cascata da inflamação.....	30
Figura 10	-	Estrutura molecular da Prostaglandina.....	31
Figura 11	-	Estrutura molecular do Ácido acetilsalicílico.....	33
Figura 12	-	Estrutura molecular de anti-inflamatórios não esteroidais	33
Figura 13	-	Fluxograma de obtenção da partição do extrato bruto etanólico de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	40
Figura 14	-	Ensaio de edema de orelha. A. Aplicação 20µL de óleo de cróton 5% na orelha esquerda. B. Excisão de fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro com auxílio de um punch. C. Fragmento da orelha esquerda.....	44
Figura 15	-	Atividade anti-inflamatória do extrato bruto etanólico das folhas de <i>Allophylus racemosus</i> Sw. no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, nas quatro primeiras horas experimentais.....	49
Figura 16	-	Atividade anti-inflamatória do extrato bruto etanólico e das frações hexânicas, hidroalcoólica e acetato nas concentrações de 1mg/orelha de <i>Allophylus racemosus</i> Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.....	52

Figura 17 -	Atividade anti-inflamatória das frações acetato e hidroalcoólica nas concentrações de 0,5mg/ orelha de <i>Allophylus racemosus</i> Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.....	53
Figura 18 -	Atividade anti-inflamatória das frações acetato e hidroalcoólica nas concentrações de 0,5mg/Kg de <i>Allophylus racemosus</i> Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.....	54
Figura 19 -	Cromatograma com a composição química do Óleo Essencial de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	56
Figura 20 -	Compostos majoritários do Óleo Essencial de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.: γ -muuroleno (1), (E)-cariofileno (2), biciclogermacreno (3) e germacreno A (4).....	57
Figura 21 -	Demais compostos do Óleo essencial de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	58
Figura 22 -	Perfis cromatográficos obtidos da fração hidroalcoólica.....	59
Figura 23 -	Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV-DAD em 254 nm mostrando a presença dos compostos da fração hidroalcoólica de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	60
Figura 24 -	Perfil cromatográfico unidimensional obtido por HPLC-UV-DAD em 254 nm mostrando a presença do composto de interesse com $tR \approx 13,89\text{min}$	61
Figura 25 -	Curva de absorção no UV para o composto de interesse ($tR \approx 13,89\text{min}$).....	62
Figura 26 -	Núcleo de um flavonoide.	62
Figura 27 -	Estrutura molecular da apigenina (1) e de uma de suas bases conjugadas (2).....	63
Figura 28 -	Espectro de massas obtido no modo negativo para a substância de interesse.....	63
Figura 29 -	Espectro de massas obtido no modo negativo para o padrão apigenina.....	64
Figura 30 -	Proposta da substância isolada com base nos dados de espectrometria de massas.....	64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	-	Outras atividades do Gênero <i>Allophylus</i>	27
Tabela 2	-	Dados da porcentagem de inibição de edema de pata.....	50
Tabela 3	-	Dados da porcentagem de inibição de edema de orelha do extrato brutoetanólico e frações de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	52
Tabela 4	-	Dados da porcentagem de inibição de edema de orelha de óleos essenciais de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	54
Tabela 5	-	Composição química do óleo essencial obtido de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN: H ₂ O	- Solução acetoneitrila água
AIEs	- Anti-inflamatórios esteroidais
AINEs	- Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA	- Análise de variância
ATF	- Acetato de tetradecanoilforbol
C	- Casca
CG	- Cromatografia gasosa
CL	- Cromatografia Líquida
CLAE	- Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEC	- Comitê Brasileiro para o cuidado de animais
COSY	- Homonuclear Correlation Spectroscopy
COX-1	- Ciclo-oxigenase 1
COX-2	- Ciclo-oxigenase 2
DAD	- Detector de arranjo de diodos
EBEAR	- Extrato Bruto Etanólico de <i>Allophylus racemosus</i> Sw.
EI-MS	- Espectrometria de massa de ionização por impacto de elétrons
EM	- Espectrometria de massas
EPM	- Erro padrão de média
EtOH/H ₂ O	- Solução etanol água
F	- Folhas
FAc	- Fração Acetato
FH	- Fração Hexânica
FHA	- Fração Hidroalcoólica
Fr	- Frutas
GC	- Gas chromatography
MS	- Mass Spectrometry
HMBC	- Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HPLC	- High Performance Liquid Chromatography
HSQC	- Heteronuclear Single Quantum Coherence Spectroscopy
IK	- Indices de Kovats
IV	- Infravermelho

KPa	- Quilopascal
LC	- liquid chromatography
mg/orelha	- Miligrama por orelha
O.E	- Óleos Essenciais
OMS	- Organização Mundial de Saúde
PGs	- Prostaglandinas
R	- Raizes
RMN	- Ressonância magnética nuclear
RMN ¹³ C	- Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN ¹ H	- Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
t _R	- Tempo de retenção
UV	- Ultravioleta
v.o	- Via oral
λ _{máx}	- Comprimento de onda máxima absorção
μg/pata	- Micrograma por pata

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	FAMÍLIA SAPINDACEAE.....	20
2.2	GÊNERO <i>Allophylus</i>	21
2.3	ESPÉCIE.....	21
2.3.1	Taxonomia e nomenclatura	21
2.3.2	Ocorrência natural	23
2.4	ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	24
2.4.1	Atividade anti-inflamatória de gênero <i>Allophylus</i>	24
2.4.2	Outras atividades biológicas de gênero <i>Allophylus</i>	27
2.5	ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO.....	28
2.5.1	Anti-inflamatório estereoidais corticoides	31
2.5.2	Anti-inflamatório não-estereoidais	32
2.6	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	34
3	JUSTIFICATIVA	35
4	OBJETIVOS	36
5	METODOLOGIAS	37
5.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	37
5.2	SECAGEM.....	37
5.3	TRITURAÇÃO.....	38
5.4	PESAGEM.....	38
5.5	MACERAÇÃO.....	38
5.6	PARTICIONAMENTO.....	39
5.6.1	Obtenção das frações hexânica, acetato e hidroalcóolica	39
5.7	LIOFILIZAÇÃO.....	41
5.8	EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	41
5.9	ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE POR <i>Allophylus racemosus</i> Sw. GC-MS.....	41
5.10	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	42
5.10.1	Animais	42
5.10.2	Teste de edema de pata induzido por carragenina	43

5.10.3	Teste de edema de orelha para extrato bruto e suas frações.	43
5.10.4	Teste de edema de orelha para óleos essenciais.....	45
5.11	HPLC.....	45
5.11.1	Preparo de amostras para análise em HPLC.....	45
5.11.2	Obtenção do perfil cromatográfico por LC-DAD.....	46
5.11.3	Isolamento do composto de interesse por LC-DAD.....	46
6	RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	48
6.1	TESTES DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA.....	48
6.2	TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA DO EXTRATO DE <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	48
6.3	TESTE DE EDEMA DE ORELHA DO EXTRATO E FRAÇÕES <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	50
6.4	TESTE DE EDEMA DE ORELHA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	53
6.5	IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE <i>Allophylus racemosus</i> Sw.....	55
6.6	ANÁLISE DA FRAÇÃO ATIVA POR LC-DAD.....	59
6.7	ISOLAMENTO DO COMPOSTO A POR LC-DAD.....	60
7	CONCLUSÃO.....	65
	REFERÊNCIAS.....	67

1 INTRODUÇÃO

A natureza sempre despertou no homem um deslumbramento, não apenas pelos recursos oferecidos para sua alimentação e manutenção, mas principalmente por ser sua principal fonte de inspiração e aprendizado (BARREIRO; BOLZANI; VIEGAS, 2006). O homem, desde o início dos tempos, sempre buscou na natureza a fonte de seu bem-estar (MACIEL et al., 2002). As primeiras descrições sobre plantas medicinais feitas pelo homem são descritas nas sagradas escrituras e ao papiro de Ebers. Evidências arqueológicas mostram que o uso de drogas era amplo em culturas antigas. A descoberta de novos continentes, em virtude das grandes navegações, introduziram no mundo moderno uma grande diversidade terapêutica de origem vegetal ao qual até hoje é indispensável à medicina (PINTO et al., 2002)

Os produtos naturais utilizados pela humanidade desde a antiguidade, tinham como um dos objetivos a busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas, talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização desses vegetais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é repleta de exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, em mecanismos de defesa e no controle de pragas, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. Sendo que a medicina tradicional chinesa se desenvolveu com tanta grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca do isolamento dos princípios ativos e pelo entendimento de seu mecanismo de ação (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006). O isolamento das primeiras substâncias puras do reino vegetal iniciou-se no século XVIII, sendo este século, juntamente com o século XIX, os que caracterizaram os trabalhos de extração, principalmente de alcalóides e ácidos orgânicos. É desta época o isolamento de morfina (1) (1806), quinina (2) e estriquinina (3) (1820) (PINTO et al., 2002).

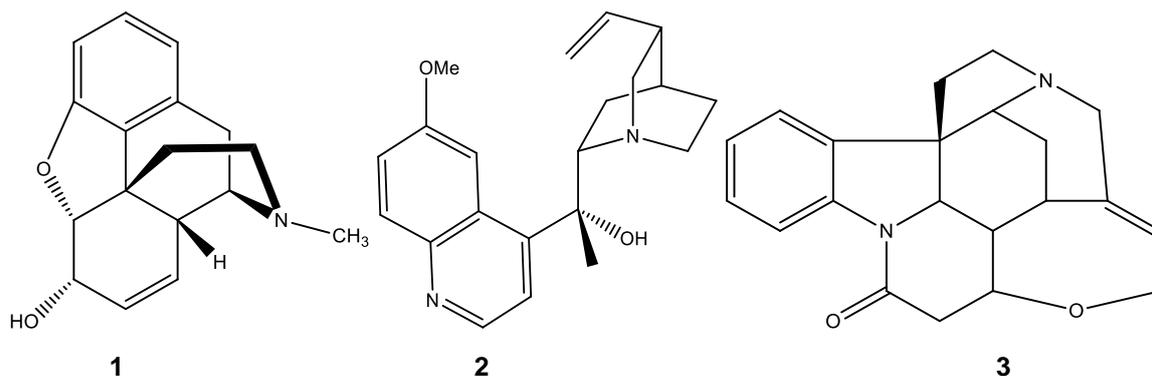


Figura 1 - Compostos orgânicos isolados no século XIX.
Fonte: (PINTO, 2002)

As plantas carregam os chamados princípios ativos, preparados pela química da natureza em milhões de anos. Segundo a ciência, os segredos da cura de muitas enfermidades estão guardados nas matas, principalmente da América Latina. No Brasil, centenas de plantas medicinais há séculos são pesquisadas e utilizadas na manutenção da boa saúde.

Embora seja muito difícil avaliar a extensão do uso global de dados de plantas medicinais, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que mais de 80% da população mundial usa a medicina tradicional rotineiramente para atender as suas necessidades primárias da saúde e muitos dos tratamentos tradicionais envolvem o uso de extratos de plantas ou as suas substâncias ativas (WHO, 2008).

O uso de plantas medicinais tem relevância socioeconômica muito grande na qualidade de vida das comunidades de baixa renda, devido a sua alta disponibilidade, baixa toxicidade, risco mínimo de efeitos colaterais e, principalmente, aos baixos custos e/ou sem ônus comparados aos medicamentos alopáticos. Esta é uma realidade muito comum no meio rural brasileiro, associada também às dificuldades de acesso aos serviços básicos de saúde pública (BESSA et al., 2007). Desta forma, muitas vezes o conhecimento sobre plantas medicinais representa o único recurso terapêutico de muitos grupos étnicos e comunidades. Nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, estas plantas são comercializadas em mercados populares, feiras livres, e podem ser encontradas também em quintais residenciais (MACIEL et al., 2002).

A utilização das plantas medicinais tem sido muito significativa nos últimos anos, merecendo incentivo da OMS. No entanto, o uso popular, e mesmo o tradicional,

não são suficientes para validar eticamente as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros (CUNHA et al., 2009). Assim, o uso das plantas para fins medicinais tem despertado um grande interesse pelo conhecimento da sua composição química. Nas últimas décadas, observa-se um amplo avanço científico no estudo dos vegetais, isso ocorre em decorrência dos processos vitais da biossíntese, que são os responsáveis pela formação, acúmulo e degradação de inúmeras substâncias orgânicas no interior das células, formando os diversos tecidos dos organismos animais e vegetais. São extraídas, dos vegetais, várias substâncias, e grande parte delas são responsáveis pela aplicabilidade na alimentação e na saúde. Em decorrência disso, dentro do âmbito da química orgânica, há um estímulo no desenvolvimento do estudo de muitas plantas, objetivando o estudo das estruturas e da química destes compostos, que é extremamente ampla e diversificada (SILVA; CONCEIÇÃO, 2010). Além disso, tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo também estudos farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas (FILHO; YUNES, 1998).

A pesquisa fitoquímica tem por objetivos conhecer os constituintes químicos das espécies vegetais ou avaliar sua presença nos mesmos. Quando não se dispõe de estudos químicos sobre a espécie de interesse, a análise fitoquímica pode identificar os grupos de metabólitos secundários relevantes (SILVA; CONCEIÇÃO, 2010).

O estudo fitoquímico de materiais vegetais é feito utilizando técnicas de separação como partição líquido-líquido, cromatografia em camada delgada, cromatografia em coluna e cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acopladas aos métodos de identificação e análise orgânica como espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN), ultravioleta (UV) e espectrometria de massas (EM). Estes estudos têm utilizado técnicas analíticas hífenadas, onde se tem a junção de métodos de separação com algum método espectroscópico/espectrométrico que forneça informações sobre a identidade dos compostos separados. A hífenação destas técnicas tem permitido o desenvolvimento de pesquisas com demanda cada vez menor de quantidades de amostras e de tempo, vantagens cruciais no desenvolvimento de pesquisas com produtos naturais (VILLA et al., 2006).

O interesse em espécies de plantas nativas da América do Sul tem crescido nos últimos anos devido aos seus benefícios à saúde. Já o Brasil, um dos maiores do mundo com uma grande diversidade de locais, com mais de 40.000 espécies de

plantas diferentes, o que representa 20% da flora mundial, segundo Oliveira et al (2012), do mesmo modo desperta um grande interesse nos estudos destas plantas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

Nesta seção serão apresentados os principais assuntos tratados neste trabalho.

2.1 FAMÍLIA SAPINDACEAE

A família Sapindaceae foi descrita por Antoine Laurent de Jussieu em 1789 (CAROLINE SPRENGEL-LIMA, 2013; CRONQUIST, 1981; ROSADO et al., 2014). Pertence à ordem Sapindales, que, segundo JUDD et al., 2002, é monofilética devido às características sinapomórficas de folhas compostas pinadas e flores com um disco nectarífero distinto na base do androginóforo.

A família Sapindaceae compreende 140 gêneros e cerca de 1900 espécies pelo mundo todo. Estas são encontradas principalmente nas regiões tropicais, com apenas alguns gêneros sendo restritos a áreas temperadas (BALOGUN; LIU, 2015; CAROLINE SPRENGEL-LIMA, 2013; MILLER; TUCK, 2013; ROSADO et al., 2014; OLADOSU). Os membros desta família podem ser encontrados na América do Sul, África e Austrália, entretanto a maioria das espécies são nativas da Ásia (ADEYEMI; OGUNDIPE; OLOWOKUDEJO, 2012). A flora brasileira abrange em torno de 25 gêneros e 420 espécies, sendo que 187 dessas espécies são endêmicas da Amazônia, Mata Atlântica e Caatinga (CAROLINE SPRENGEL-LIMA, 2013; SIEGLOCH; MARCHIORI; SANTOS, 2013; ROSADO et al., 2014; BARBOSA; SILVA; OLIVEIRA, 2015). *Serjania Vell.* é o maior gênero, com 220 espécies, seguida por *Paullinia L.* com 150 espécies e *Allophylus L.* com 100 espécies (BARBOSA; SILVA; OLIVEIRA, 2015).

O potencial econômico da flora é altamente significativo, e na família Sapindaceae, particularmente, este potencial é muito extenso, principalmente quando se analisa as espécies componentes sob as mais diferentes formas de utilização (NETO; SANTANA; SILVA, 2000). Dentre suas espécies, algumas são mais conhecidas, como: *Paullinia cupana* Kunth (guaraná), endêmica da região amazônica cujos frutos são utilizados na fabricação de sucos e refrigerantes ; *Sapindus saponaria*

L. (sabonete-de-soldado), nativa no Brasil, possui frutos com saponinas, substâncias que podem ser utilizadas como sabão e, apresentam também, algumas espécies de *Paullinia* e *Serjania* que são tóxicas e utilizadas pelos índios no envenenamento de flechas. (ROSADO et al., 2014).

2.2 GÊNERO *Allophylus*

Allophylus foi descrito por Linnaeus em 1753. Após sua publicação, os estudos sobre o gênero foram feitos por Radlkofer, em 1900, 1931 e 1934 (COELHO, 2014). O gênero *Allophylus* compreende cerca de 255 espécies (ZHANG; CAI; LUO, 2012). Das 43 espécies de *Allophylus* que ocorrem na região neotropical, três delas merecem destaque pois ocorrem em quase todas as regiões em que o gênero se encontra distribuído: *Allophylus punctatus*, *Allophylus racemosus* e *Allophylus strictus*. Todos são encontradas desde o México, passando pela América Central, entretanto *Allophylus punctatus* tem limite sul na América do Sul na região amazônica, *Allophylus racemosus* é encontrada também na região sudeste do Brasil e *Allophylus strictus* passa ainda na Bolívia, pelos cerrados da região centro-oeste e a região nordeste do Brasil, no estado da Bahia.(COELHO, 2014).

2.3 ESPÉCIE

Nesta seção serão descritas informações encontrados na literatura sobre a espécie em estudo.

2.3.1 Taxonomia e nomenclatura

De acordo com Integrated Taxonomic Information System, ITIS report, a posição taxonômica de *Allophylus racemosus* Sw. obedece à seguinte hierarquia:

- reino: Plantae;
- divisão: Magnoliophyta;
- classe: Magnoliopsida;
- subclasse: Rosidae;
- ordem: Sapindales;
- família: Sapindaceae;
- gênero: *Allophylus*;
- espécie: *Allophylus racemosus* Sw.

A espécie apresenta nomes vulgares aplicados em algumas regiões do país: Centro-oeste e Sudeste, veadinho e mama-de-cachorro; Nordeste, guariba e farinha-seca e Norte, casca-solta-mirim (SOMNER et al., 2016). Nos países da América Central, também podem ser chamados de fandifiana, fragueiro-branco, hugum, kajoe-sindoe.lpak, kisawaru, koreaf, li'mikaha, maculelê, monte-jatcco, mote-mote, mulangueiro, mullo, naseikilei, ngunese, onjob, palo-Brasil, pata-de-cotuia, pie-de-pajara, tillo, três-irmãos e zavaleta (COELHO, 2014).

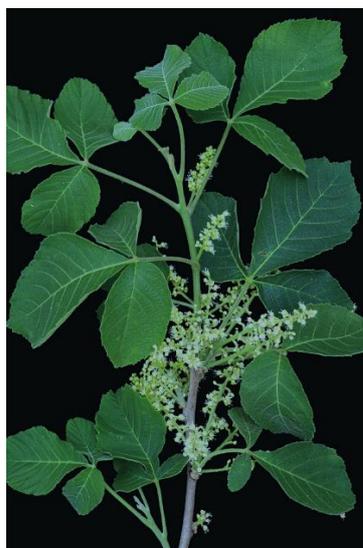


Figura 2 - *A. racemosus* Sw. Ramo florífero.
Fonte: (COELHO, 2014)



Figura 3 - *A. racemosus* Sw. Ramo frutífero.
Fonte: (COELHO, 2014)



Figura 4 – *Allophylus racemosus* Sw. A: ramo frutífero; B: ilustração de ramo frutífero; C-F: ramos frutíferos.
Fonte: (COELHO, 2014)

2.3.2 Ocorrência natural

Distribuição geográfica e habitat: espécie distribuída por toda a região neotropical. Encontrada no Brasil, Colômbia, Costa Rica, Cuba, El Salvador, Equador, Guatemala, Guiana, Honduras, Nicarágua, República Dominicana e Venezuela, além de diversas outras ilhas na América Central (Antilhas) (COELHO, 2014). No Brasil encontra-se distribuída no Norte pelos estados do Amazonas, Pará, Roraima e Tocantins; no Nordeste pelos estados da Bahia, Ceará, Maranhão, Paraíba, Pernambuco, Piauí; no Centro-oeste pelos estados Goiás e Distrito Federal; no Sudeste pelos estados de Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo (SOMNER et al., 2016). É preferencialmente distribuída em florestas secas, estacionais ou savanas. Raramente encontrada em florestas tropicais úmidas tanto na América Central quanto na América do Sul. Geralmente ocorre em solos secos pedregosos e pode também ser encontrada próxima a cursos d'água (COELHO, 2014).



Figura 5 - Distribuição geográfica de *Allophylus racemosus* Sw.
Fonte: (COELHO, 2014)

2.4 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Nesta seção será abordada a atividade anti-inflamatória e as demais atividades biológicas do gênero *Allophylus*.

2.4.1 Atividade anti-inflamatória do gênero *Allophylus*

Dentre as espécies do gênero que têm atividade anti-inflamatória, relatadas na literatura, estão presentes: *Allophylus cominia* (OLIVA-HERNÁNDEZ et al., 2013), *Allophylus edulis* (DÍAZ et al., 2008; DÍAZ et al., 2014), *Allophylus longipes* (ZHANG;

CAI; LUO, 2012) e *Allophylus serratus* (DHARMANI et al., 2005; PRIYA; SELVAN; TAMILSELVAN, 2012).

Os extratos clorofórmicos das folhas de *Allophylus cominia* (L) Sw foram testados e de acordo com os resultados obtidos, há efeito inibitório por COX-2, em que as atividades anti-inflamatórias envolvem a cascata de eicosanoides, inibindo a síntese das prostaglandinas (PGs). *Allophylus cominia* (L) Sw é uma das plantas medicinais mais populares de Cuba. Neste estudo não há relatos de substâncias isoladas para demonstrar qual a responsável pela redução da inflamação (OLIVA-HERNÁNDEZ et al., 2013).

Fitoquimicamente tem sido relatada a presença majoritária de compostos fenólicos a partir do extrato de folhas e galhos de *Allophylus edulis*. Esta planta é comumente utilizada como uma fonte de taninos e óleos essenciais. Uma tisana (infusão) das folhas é etnicamente usada como um agente anti-inflamatório da garganta (DIAZ et al., 2008). É uma planta nativa brasileira conhecida popularmente como “chal chal”, “cocum”, “fruto do pombo” e também são encontradas na Argentina, Bolívia, Uruguai e Guianas (TIRLONI et al., 2015). Um dos compostos isolados de *Allophylus edulis* relatado na literatura que possui atividade anti-inflamatória é o Lupeol (4) (CRĂCIUN et al., 2011).

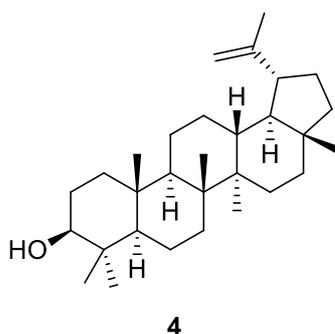


Figura 6 – Lupeol, composto orgânico isolado de *Allophylus edulis* com atividade anti-inflamatória.

Fonte (DIAZ, 2014)

Historicamente *Allophylus longipes* tem sido utilizada etnofarmacologicamente pelo povo 'Dai' para o tratamento de resfriado e inflamação. Esta planta apresenta 25 compostos que foram isolados e identificados, dentre os quais dois estão relacionados

com a atividade anti-inflamatória: aldeído betulínico (5) e 1-O-p-coumaroylglicose (6) (ZHANG; CAI; LUO, 2012).

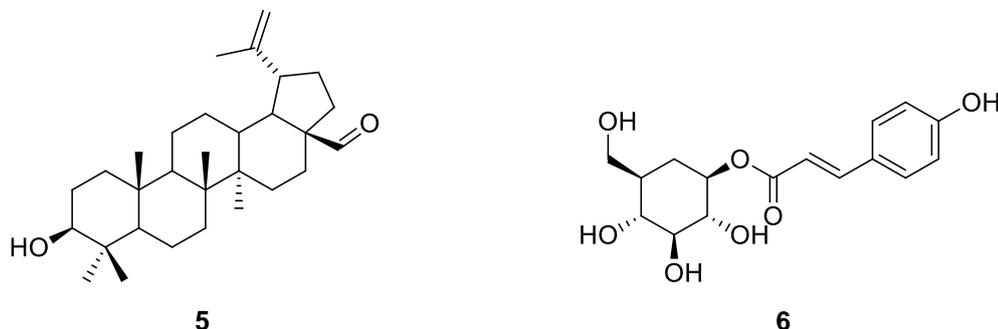


Figura 7 - Compostos orgânicos isolados de *Allophylus longipes* com atividade anti-inflamatória.

Fonte: (ZHANG; CAI; LUO, 2012)

No sistema indiano de medicina (Ayurveda), *Allophylus serratus* é uma planta utilizada como um agente anti-inflamatório (DHARMANI et al., 2005; KUMAR et al., 2010). Dentre os compostos já isolados desta planta, alguns merecem destaque por apresentarem atividade anti-inflamatória: Quercetina (7) (GARDI et al., 2015); Pinitol (8) (SINGH et al., 2001); e Rutina (9) (SU et al., 2014).

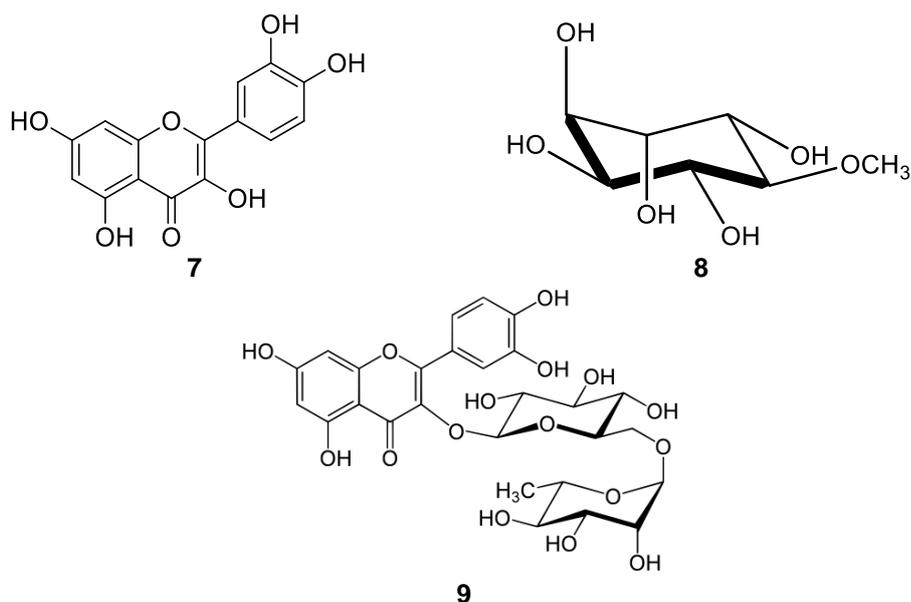


Figura 8 - Compostos orgânicos isolados de *Allophylus serratus* com atividade anti-inflamatória.

Fonte: (GARDI et al., 2015; SINGH et al., 2001; SU et al., 2014)

2.4.2 Outras atividades biológicas do gênero *Allophylus*

Diversas espécies do gênero apresentam, além da atividade anti-inflamatória, outras atividades farmacológicas, de acordo com a tabela 1:

Tabela 1 - Outras atividades do Gênero *Allophylus*.

(Continua)		
PLANTA	ATIVIDADE (PARTES DA PLANTA)	REFERÊNCIA
<i>Allophylus africanus</i>	Atividade Antioxidante (F)	BALOGUN;
	Conjuntivite (F)	OLADOSU; LIU,
	Enxaqueca (F)	2014
	Cólica (F)	DÍAZ et al., 2014
	Febre (F)	OLADOSU;
	Malária (C e R)	BALOGUN;
	Diarreia (C e R)	ADEMOWO, 2013
	Atividade germicida (C e R)	
	Atividade antiplasmódica (R)	
<i>Allophylus cobbe</i>	Atividade Antioxidante (F)	ANKAD et al., 2016
	Atividade antimicrobiana (F)	
	Febre (F)	
	Diarreia (F)	
	Fraturas (F)	
	Elefantíase (F)	
<i>Allophylus cominia</i>	Atividade hipoglicemiante	OLIVA- HERNÁNDEZ et al., 2013
		RODRIGUEZ et al., 2005
<i>Allophylus edulis</i>	Anti-hepatotóxica (F)	DÍAZ et al., 2008
	Atividade inotrópica negativa (F)	TIRLONI et al.,
	Ação inibidora da ECA (F)	2015

Tabela 1 - Outras atividades do Gênero *Allophylus*.

PLANTA	ATIVIDADE (PARTES DA PLANTA)	(Conclusão)
		REFERÊNCIA
	Desordens intestinais (F)	DÍAZ et al., 2014
	Antiulcerogênicas (F)	
	Atividades genotóxicos (F)	
	Atividade antimicrobiana (F)	
	Ação antioxidante (Fr)	
<i>Allophylus laevigatus</i>	Atividade Antioxidante	DAVID; DOS SANTOS; DAVID, 2004
<i>Allophylus rubifolius</i>	Atividade Antioxidante	DÍAZ et al., 2014

Fonte: (Autor)

* C: Casca *F: Folhas *Fr: Frutas *R: Raízes

2.5 ASPECTOS DA INFLAMAÇÃO

A inflamação é um mecanismo de defesa do sistema imunitário à infecção ou lesão do tecido, causada por traumas físicos, por substâncias químicas nocivas ou agentes microbiológicos, como bactérias, parasitas e vírus (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; RANG et al., 2004; SANTA-CECÍLIA et al., 2011; CARDINAL et al., 2016). É uma complexa reação estereotípica do corpo que expressa às respostas aos danos das células e tecidos vascularizados, caracterizados por rubor e calor, que são decorrentes do aumento do fluxo sanguíneo, o inchaço, que está associado com aumento da permeabilidade vascular, a dor, que é consequência da ativação e sensibilidade das fibras nervosas primárias, podendo chegar a perda da função do local inflamado dependendo da gravidade (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; RANG et al., 2004).

As respostas inflamatórias ocorrem em 3 fases distintas, sendo cada uma aparentemente mediada por diferentes mecanismos:

- a) Uma fase transitória aguda, caracterizada por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar;

- b) Uma fase subaguda tardia, caracterizada mais proeminentemente pelo recrutamento dos leucócitos e células fagocíticas;
- c) Uma fase proliferativa crônica, em que ocorrem degeneração tecidual e fibrose (HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

A inflamação representa o esforço do organismo no sentido de inativar ou destruir microrganismos invasores, remover substâncias irritantes e iniciar o estágio de reparação tecidual. A capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é fundamental à sobrevivência e essa independe da natureza do agente que a iniciou (RANG et al., 2004).

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (KUMMER; COELHO, 2002). A resposta imune ocorre quando as células imunologicamente competentes são ativadas em reação a organismos estranhos ou substâncias antigênicas liberadas durante a resposta inflamatória, seja essa, aguda ou crônica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores, que não são proeminentes na resposta aguda. Uma das afecções mais importantes associadas a esses mediadores é a artrite reumatoide, em que a inflamação crônica produz dor, inchaço e vermelhidão, resultado do ataque aos tecidos do próprio organismo, principalmente das articulações, podendo provocar grave incapacidade na qual ocorrem alterações sistêmicas que podem reduzir a sobrevida do indivíduo (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).

No processo inflamatório ocorre a liberação de ácido araquidônico, a partir de compostos precursores, sintetizando vários eicosanoides. A via da ciclo-oxigenase (COX) do metabolismo do araquidônico produz tromboxanos, prostaciclina e prostaglandinas, que exercem uma variedade de efeitos nos vasos sanguíneos, nas terminações nervosas e nas células envolvidas na inflamação, como pode ser observado na figura 9 (OLIVA-HERNÁNDEZ et al., 2013). A via lipoxigenase (LOX) outra via do metabolismo do ácido araquidônico produz leucotrienos, que exercem um poderoso efeito quimiotático nos eosinófilos, nos neutrófilos e nos macrófagos, e que também promovem broncoconstrição e alterações da permeabilidade vascular. A descoberta das duas isoformas da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) levou ao conceito de que a isoforma COX-1 construtiva tende a ser homeostática, enquanto a

COX-2 é induzida durante a inflamação e facilita a resposta inflamatória. Com base nesses conceitos, foram desenvolvidos e comercializados inibidores altamente seletivos da COX-2, partindo da suposição de que seriam mais seguros do que os inibidores não seletivos da COX-1, porém sem perda da eficácia (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).

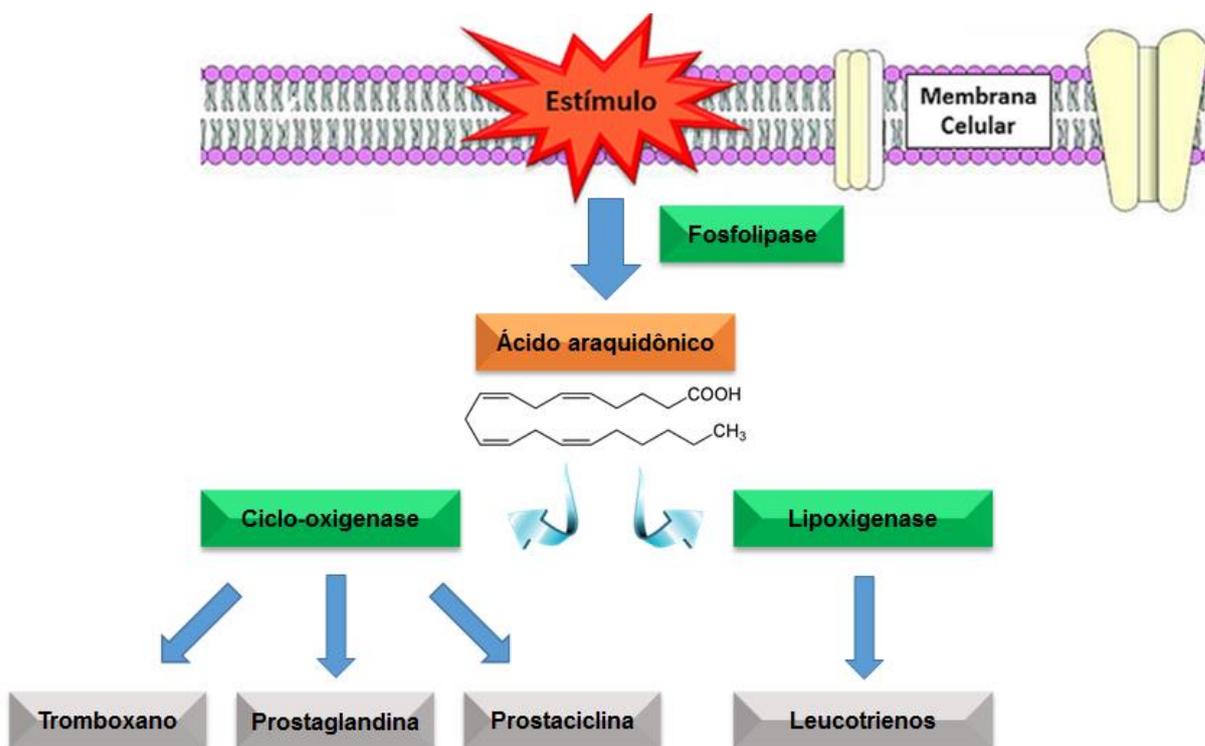


Figura 9 - Esquema representativo da cascata da inflamação.

Fonte: [\(Autor\)](#)

As prostaglandinas (PGs) são ácidos carboxílicos insaturados de 20 carbonos com um anel de ciclopentano. Após a evidência da estrutura geral (10), verificou-se que há uma relação com os ácidos graxos essenciais, relação esta, que mais tarde, pôde-se constatar que as famílias das prostaglandinas, conhecidas como eicosanoides, se originaram de ácidos graxos de 20 carbonos que contém 3, 4 ou 5 ligações duplas (HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

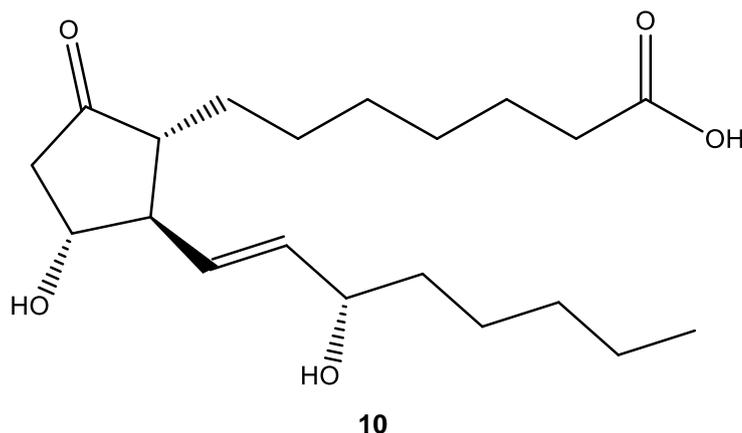


Figura 10 - Estrutura molecular da Prostaglandina.

Fonte: (HARDMAN; LIMBIRD, 2005)

As PGs, originárias da cascata do ácido araquidônico, são produzidas no estágio inicial da lesão inflamatória. O entendimento da biossíntese desta substância é fundamental para a compreensão da ação dos fármacos anti-inflamatórios. Muitos estudos indicam que a inibição da síntese das prostaglandinas é o mecanismo principal das ações terapêuticas dos medicamentos anti-inflamatórios. Sendo que a ação de vários fármacos acontece pela inibição da síntese das PGs (HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

As PGs estão particularmente associadas ao desenvolvimento da dor que acompanha inflamação e/ou lesão. Estudos envolvendo a mensuração eletrofisiológica da descarga nervosa sensorial na presença de PGs indicaram que quando as PGs foram administradas, os receptores da dor se tornaram mais sensíveis a estímulos químicos ou mecânicos (HARDMAN; LIMBIRD, 2005).

2.5.1 Anti-inflamatórios esteroidais- corticoides

Os anti-inflamatórios esteroidais (AIEs) são drogas que mimetizam os efeitos do hormônio cortisol. Este hormônio é essencial à vida, sendo responsável por vários processos, desde o estado de embrião. Além de possuir efeitos metabólicos próprios, também age amplificando o efeito de outros hormônios no organismo humano.

Os AIEs, quando administrados terapêuticamente, exibem poderosos efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores. Inibem as manifestações tanto iniciais quanto tardias da inflamação, isto é, não apenas o rubor, o calor, a dor e o edema iniciais, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparo de feridas e reações proliferativas observadas na inflamação crônica. Afetam todos os tipos de reações inflamatórias, sejam elas causadas por patógenos invasores, por estímulos químicos ou físicos ou por respostas imunes inadequadamente desencadeadas, como aquelas observadas na hipersensibilidade ou na doença autoimune (RANG et al., 2004).

Os corticosteroides intra-articulares costumam ser úteis para alívio dos sintomas dolorosos e, quando bem-sucedidos, são preferíveis a um aumento da dose da medicação sistêmica (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).

Prednisona, dexametasona, betametasona são exemplo de AIEs (corticoides) (RANG et al., 2004).

2.5.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais

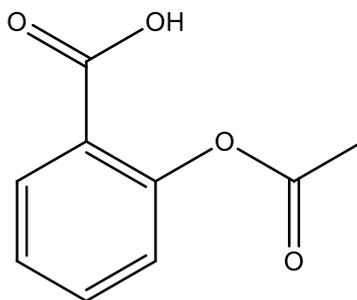
Os principais representantes do grupo dos eicosanoides inibidos pelos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são as prostaglandinas, as prostaciclina e os tromboxanos. Os AINEs, basicamente, atuam sobre as enzimas prostaglandina sintetases, mais conhecidas como ciclooxigenase-1 (COX-1), com ampla distribuição tecidual, e sobre a ciclooxigenase-2 (COX-2) cujo gene, apesar de possuir distribuição tecidual semelhante, na maioria dos casos, somente é expresso em condições patológicas (ABDELLATIF et al., 2016).

Os agentes AINEs estão entre os agentes terapêuticos mais amplamente utilizados no mundo todo. São empregados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatoide e distúrbios musculoesqueléticos (BATLOUNI, 2010). Existem mais de 50 AINEs diferentes no mercado, porém nenhum deles é ideal para controlar ou modificar os sinais e sintomas da inflamação, particularmente aqueles observados nas doenças articulares inflamatórias comuns. Praticamente todos os AINEs disponíveis no

momento, sobretudo os AINEs " clássicos ", podem apresentar efeitos indesejáveis significativos, particularmente no indivíduo idoso (RANG et al., 2004).

Os AINEs abrangem uma variedade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas. Muitos desses fármacos apresentam além dos efeitos anti-inflamatórios, efeitos analgésico - redução de certos tipos de dor – e antipirético - redução da temperatura elevada (RANG et al., 2004).

O medicamento aspirina, que apresenta como fármaco o ácido acetilsalicílico (11), um exemplo de AINE está entre os primeiros fármacos a serem sintetizados (RANG et al., 2004). Porém é considerado separadamente dos demais, por seu uso predominante no tratamento das doenças cardiovasculares e cerebrovasculares, em doses baixas (BATLOUNI, 2010). E por apresentar diversos efeitos adversos, foram desenvolvidos muitos outros AINEs na tentativa de aumentar sua eficácia e diminuir sua toxicidade (RANG et al., 2004; KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).



11

Figura 11 - Estrutura molecular do Ácido acetilsalicílico.
Fonte: (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013)

Os salicilatos e outros fármacos semelhantes usados no tratamento da doença reumática compartilham a capacidade de suprimir os sinais e os sintomas da inflamação (KATZUNG; MASTERS; TREVOR, 2013).

Outros exemplos de AINEs que podem ser citados são: indometacina (12), ibuprofeno (13) e naproxeno (14), sendo estes não seletivos para COX (BATLOUNI, 2010).

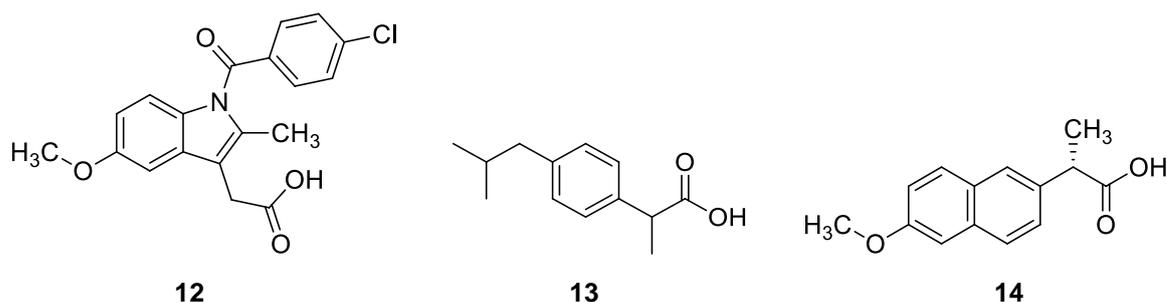


Figura 12 - Estrutura molecular de Anti-inflamatórios não-esteroidais.
Fonte: (Autor)

2.6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Além dos extratos, podem ser obtidos das plantas os óleos essenciais, sendo que esses apresentam uma composição complexa, contendo algumas centenas de componentes. Na maior parte, os seus componentes são classificados como terpenos (oxigenados ou não), monoterpenos e sesquiterpenos (RAMOS-LOPEZ et al., 2011).

A composição de um óleo é determinada pela espécie vegetal que o produz e pela parte do vegetal em que se encontra (folhas, casca, sementes, por exemplo) e podem ser extraídos a partir destas peças, onde eles são armazenados nas células secretoras, cavidades, canais ou células epidérmicas tricomas glandulares. A composição pode sofrer variações, pelo estágio de desenvolvimento da espécie, pelas condições ambientais (temperatura, umidade relativa, tempo de exposição ao sol e ventos que afetam os vegetais), pelas condições de colheita (geralmente, deve ser bem cedo pela manhã, pois o calor do sol pode levar a perdas quantitativas) e pela forma de obtenção. Eles são líquidos oleosos, aromáticos voláteis, caracterizados por um forte odor, raramente coloridos, e geralmente com uma densidade mais baixa do que a da água (MIGUEL, 2010).

Os óleos essenciais podem exibir atividades relacionados com a indústria de alimentos, cosméticos e também cuidados com a saúde (RAMOS-LOPEZ et al., 2011; FALEIRO; MIGUEL, 2013). Esses, extraídos a partir de plantas, são também conhecidos pelas suas atividades biológicas, incluindo o processo anti-inflamatório e atividade antioxidante (MIGUEL, 2010; RAMOS-LOPEZ et al., 2011).

3 JUSTIFICATIVA

A necessidade de novas substâncias terapêuticas mais eficazes, com baixa toxicidade e maior especificidade, tem intensificado os estudos para a descoberta de novos fármacos. Aproximadamente 25% dos fármacos empregados, atualmente, nos países industrializados advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais (PIMENTA et al., 2012). Compostos naturais que se apresentam inativos ou poucos ativos em determinado modelo farmacológico, podem ser levados a compostos com relevantes efeitos biológicos, através de simples modificações estruturais (PENNACCHIO et al., 2005).

O conhecimento das atividades farmacológicas abordadas nos representantes do gênero *Allophylus*, tem como principal justificativa a contribuição para a busca de moléculas detentoras de ação medicinal, podendo fornecer resultados importantes para o uso e descoberta de substâncias promissoras para tornarem-se fármacos. Isso é de extremo valor, uma vez que pode resultar em medicamentos com menos efeitos colaterais e mais eficazes.

O gênero *Allophylus* contém cerca de 250 espécies, e poucas destas foram estudadas, mesmo tendo importantes funções farmacológicas, como visto na literatura especializada.

Visando aprimorar os estudos do gênero, e mais especificamente da espécie *Allophylus racemosus* Sw., vislumbra-se avaliar as propriedades farmacológicas dos seus extratos (matriz orgânica) e constituintes químicos, proporcionando importantes informações, uma vez que na literatura não há relatos sobre informações de sua utilização com atividade anti-inflamatória e tampouco de compostos isolados.

4 OBJETIVOS

A proposta deste trabalho constituiu na realização do estudo fitoquímico das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. de modo a contribuir para o conhecimento do gênero e principalmente da espécie, uma vez que há escassos relatos na literatura.

Os experimentos químicos realizados neste trabalho envolvem:

- a) Obtenção do extrato bruto etanólico e das partições acetato de etila, hexano e hidroalcoólica das folhas de *Allophylus racemosus* Sw.;
- b) Obtenção do óleo essencial de *Allophylus racemosus* Sw.;
- c) Identificação dos constituintes do óleo essencial de *Allophylus racemosus* Sw, analisado por cromatografia gasosa e identificados através da comparação de dados da literatura (ADAMS, 2009).
- d) Fracionamento dos extratos por meio de processos cromatográficos;
- e) Isolamento e identificação das estruturas moleculares dos constituintes químicos bioativos presentes nos extratos da planta em estudo, através de métodos cromatográficos e espectroscópicos usuais como CLAE, UV e RMN;
- f) Avaliação do potencial da atividade anti-inflamatória do extrato bruto, das partições e dos óleos essenciais da planta em estudo.

5 METODOLOGIAS

Nesta seção serão apresentados os reagentes e equipamentos, assim como os métodos e testes biológicos utilizados para obtenção dos resultados.

5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

Folhas de *Allophylus racemosus* Sw. foram coletadas pelo grupo do Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal da UNIFAL-MG no sítio São José localizado na zona rural do município de Alfenas-MG, em Setembro de 2013, cujas coordenadas geográficas são: Longitude S 21° 26' 02.0" e Latitude W 046° 09' 00.7".

A identificação botânica foi realizada na Universidade Federal de Alfenas pelo Professor Dr. Marcelo Polo (Instituto de Ciências da Natureza). A espécie foi catalogada numa exsicata sob o número UALF 2628 e depositada no herbário da Universidade Federal de Alfenas.

5.2 SECAGEM

Após a coleta, os materiais vegetais das folhas foram distribuídos uniformemente em bandejas de alumínio. Este foi submetido ao processo de secagem para a retirada de água, uma vez que este processo proporciona uniformidade, precisão de dosagem, peso, facilidade de manuseio, transporte e um maior tempo de armazenamento, por evitar a proliferação de microrganismos que possam degradar os constituintes existentes. Também dificulta as atividades enzimáticas e deteriorações físico-químicas, o que pode causar erros nas análises posteriores. A secagem foi realizada em estufa com circulação de ar, para favorecer a homogeneidade do processo, por 72 horas em temperatura de 45°C. Após este tempo os materiais vegetais das folhas apresentaram-se quebradiços.

5.3 TRITURAÇÃO

O material vegetal foi triturado em moinho de facas para garantir a homogeneidade do tamanho de partículas. Com a trituração criou-se uma maior superfície de contato para o arraste das substâncias de modo eficaz pelo solvente adotado.

5.4 PESAGEM

A fim de conhecer o rendimento de extrato a partir da massa de material vegetal, toda massa utilizada foi pesada para o posterior cálculo do rendimento. O peso do material vegetal obtido foi de 192,1 gramas.

5.5 MACERAÇÃO

A maceração é, dentre outros, um procedimento utilizado para obter os constituintes químicos, metabólitos secundários, existentes em plantas para estudos fitoquímicos. A técnica adotada foi a utilização de etanol como solvente para a solubilização das substâncias presentes. O etanol possui vasta afinidade e consegue extrair inúmeras classes de compostos, formando solução. Foram realizadas quatro macerações, com intervalo de 48hs. A solução constituintes/etanol foi concentrada em rota-evaporador, originando o extrato bruto etanólico das folhas *Allophylus racemosus* Sw.

Para o total de 192,1 g de material vegetal foi utilizado 4,3 L de solvente, em 4 etapas. A solução constituintes/etanol foi concentrada em rota-evaporador, originando 14,2 g do extrato bruto etanólico das folhas de *Allophylus racemosus* Sw., obtendo rendimento de 7,39%.

5.6 PARTICIONAMENTO

O processo de partição líquido-líquido é uma estratégia muito importante para separar substâncias de mesma polaridade, e tem como função, iniciar os trabalhos de isolamento dos constituintes químicos e avaliar atividades farmacológicas para os extratos e de suas partições de forma preliminar. Sendo assim, o extrato das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. foi particionado e os solventes utilizados foram hexano e acetato de etila em ordem crescente de polaridade.

5.6.1 Obtenção das frações hexânica, acetato e hidroalcoólica

Para a realização da partição líquido-líquido, o extrato bruto etanólico das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. foi resuspenso em uma solução EtOH/H₂O (1:2), no qual utilizou 200mL de etanol e 400mL de água, e transferido para um funil de separação com capacidade adequada para a realização da técnica. Após obtenção da suspensão do extrato em EtOH/H₂O foram adicionados:

- a) 200mL de hexano (3X), para a retirada de compostos apolares, característicos dessa fase, originando a fração hexânica (FH);
- b) 200 mL de acetato de etila, (3X), para a retirada de compostos que possuam polaridade intermediária, originando a fração acetato (FAc);
- c) Concentração da torta remanescente (EtOH/H₂O), onde compostos de elevada polaridade estarão presentes, originando a fração hidroalcoólica (FHA).

Visando o esgotamento das substâncias presentes em cada uma das fases, que apresentam afinidade ao sistema de partição, os volumes padrões de solventes utilizados ocorreram com 3 repetições, como mencionado anteriormente, de 200mL cada. Os solventes foram eliminados posteriormente com a utilização de um rota-evaporador.

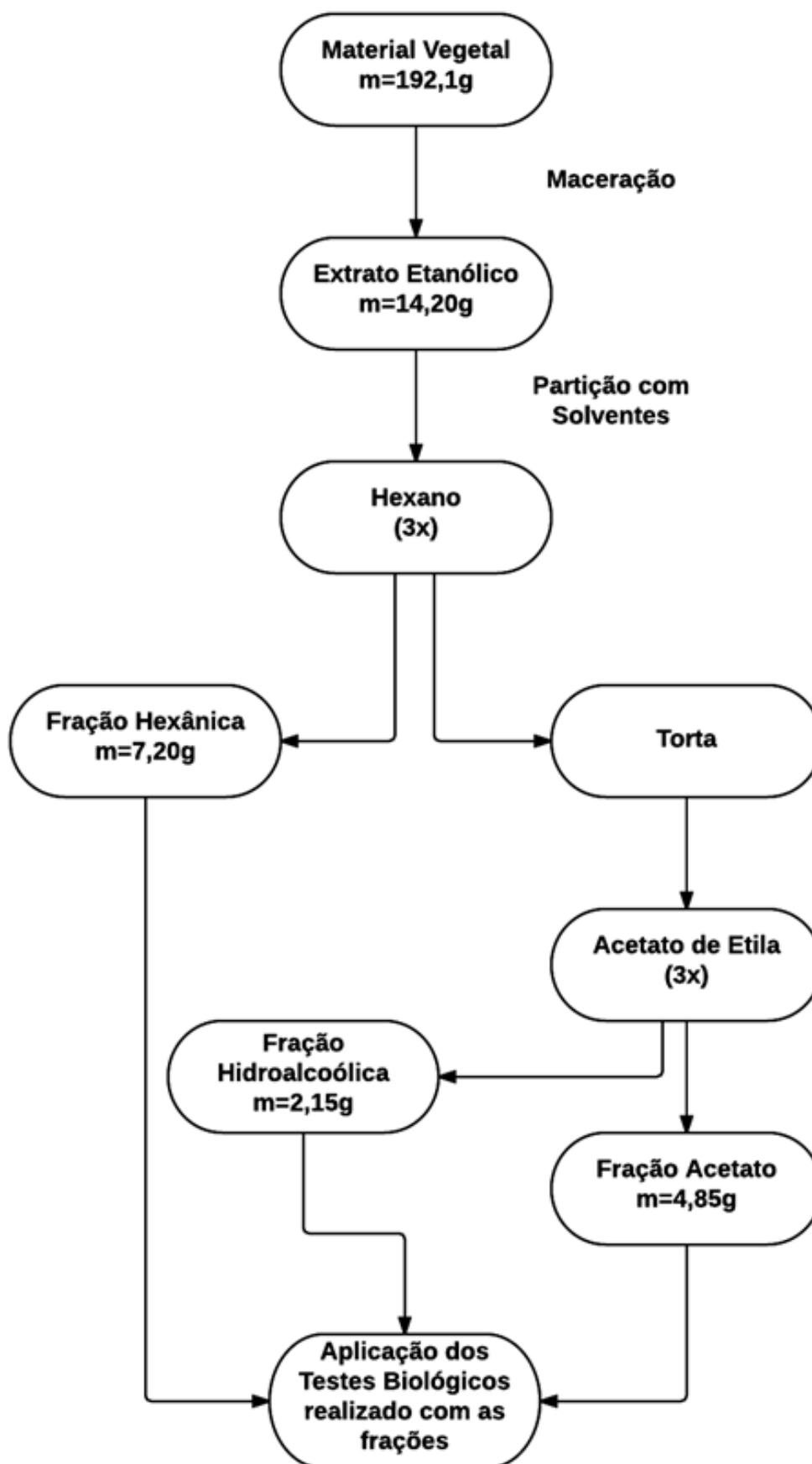


Figura 13 - Fluxograma de obtenção da partição do extrato bruto etanólico de *Allophylus racemosus* Sw.

Fonte: (Autor)

5.7 LIOFILIZAÇÃO

A liofilização é largamente aplicada ao tratamento de extratos de plantas. É um processo que retira a água do produto congelado por sublimação. A retirada de solventes e água em processos que são dependentes diretos de temperatura não é apropriado, uma vez que a maioria dos extratos de plantas possui substâncias que podem ser degradadas ou convertidas pela ação de temperatura elevada, assim a análise de constituintes químicos pode ser prejudicada, por não se ter conhecimento das propriedades físicas e químicas dos compostos presentes na matriz vegetal. As partições, originadas do extrato bruto etanólico de *Allophylus racemosus* Sw., foram levadas para acondicionamento em freezer a -20 °C, após, o material congelado foi submetido ao processo de liofilização a uma temperatura média de -42°C e a baixa pressão (liofilizador LJJ04 Cientifica) até a total remoção do conteúdo de água e acondicionado novamente ao freezer a -20 °C até seu uso.

5.8 EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Folhas frescas de *Allophylus racemosus* Sw. (300 g) foram submetidas a destilação a vapor, num aparelho de tipo Clevenger, por aproximadamente 4 horas, onde se obteve cerca de 1 mL do óleo essencial, após o mesmo passar pelo processo de secagem com sulfato de sódio anidro. O óleo essencial obtido foi mantido sob refrigeração até ser analisado através de GC-MS e a realização do teste de atividade anti-inflamatória.

5.9 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Allophylus racemosus* Sw. POR GC-MS

A análise do óleo essencial de *Allophylus racemosus* Sw. foi realizada por CG-MS em um cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A conectado a um espectrômetro de

massas MS-QP-5050A., com injetor automático split (Shimadzu AOC-20i), coluna capilar RtX-5 (5% fenil, 95% polidimetilsiloxano 30 m x 0,32 mm x 0,25 µm; Restek, Bellefonte, PA, USA) e tratamento de dados através do software GC-MS Solution. Essa análise foi realizada pela injeção de 1,0 µL, com temperatura de 225 °C, em um modo Split, split ratio, 50:1; a temperatura da interface foi de 250°C, sendo Hélio o gás carregador utilizado com uma velocidade de 46,1 cm/s linear e pressão de 99,3 KPa; a temperatura do detector foi de 240°C, operando com o seguinte programa de temperatura do forno: 60°C mantida durante 2 minutos, elevando-se a 3°C/min até 240°C, mantida durante 5 min. Sendo a temperatura da fonte de 200°C e a temperatura da interface de 250°C. As análises em EI-MS foram conduzidas sob uma voltagem de 70 eV e a temperatura da fonte ionizadora foi de 200°C. Os índices de retenção de todos os compostos foram determinados pelo índice de Kovats. A identificação dos compostos do óleo essencial foi feita individualmente comparando-se os índices de Kovats e espectros de massas juntamente com os padrões de fragmentação, daqueles compostos já descritos na literatura (ADAMS, 2009).

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

Nesta seção serão expostos os testes biológicos realizados.

5.10.1 Animais

Os animais foram fornecidos pelo Centro de Biotério da UNIFAL-MG e mantidos em câmaras com temperatura controlada ($20 \pm 2^\circ\text{C}$) em ciclos claro-escuro de 12 horas, com água e ração *ad libitum*. Foram utilizados camundongos albinos *Swiss* machos, adultos (25-35 g) aclimatados às condições do laboratório, sendo agrupados em grupos de até 10 animais. As experiências foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAL-MG (protocolo de aprovação número

612/2015), que seguiu as regras do Comitê Brasileiro para o cuidado com animais (COBEA).

5.10.2 Teste de edema de pata induzido por carragenina

Para a realização do teste de edema de pata induzido por carragenina, grupos de 8 camundongos foram tratados com o extrato bruto etanólico de *Allophylus racemosus* Sw. (EBEAR), indometacina 10mg/Kg (v.o) e veículo 10mg/Kg (v.o), nas doses de 30, 100 e 300mg/Kg (v.o). Transcorrido 60 minutos da administração, foi induzido o edema na pata pela injeção de carragenina (800µg/pata) como agente inflamatório no volume de 800µL, o qual foi aplicado na região plantar de uma das patas posteriores dos camundongos, e na outra pata foi injetado volume idêntico de solução salina, como controle. Cada pata do animal foi imersa em um pletismômetro até a região tíbio-társica e o edema foi demonstrado como o aumento no volume da pata injetada, comparando os volumes antes, e depois da administração da carragenina em uma, duas, três e quatro horas (WINTER; RISKY; NUSS, 1982). Os dados foram expressos como médias \pm SEM e analisadas utilizando um ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$). O programa utilizado para computação dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

5.10.3 Teste de edema de orelha para extrato bruto e suas frações

Este ensaio foi baseado na metodologia revisada por TUBARO et al., 1986. A inflamação cutânea foi induzida na orelha esquerda dos camundongos, utilizando grupos com 8 animais, pela aplicação tópica de 20µL do óleo de cróton a 5% (v/v) dissolvido em acetona (Fig. 13 A). Na orelha direita foi aplicada somente acetona, utilizada como veículo. O ensaio sempre foi iniciado no mesmo período da manhã (9h - 12h) para evitar interferência com variação circadiana no nível de corticosteróides (SOLIMAN et al., 1983). Trinta minutos após a aplicação de 20 µL da solução irritante

(óleo de cróton), foi realizado tratamento tópico com doses do EBEAr e das frações, dissolvidas em acetona ou água Milli-Q. O veículo da fração hidroalcoólica foi 20% de água Milli-Q em glicerina, já o veículo do EBEAr, das frações hexânicas e frações acetato foram 20% de acetona em glicerina. As doses testadas do EBEAr e das três frações foram de 1mg/orelha e posteriormente, as frações que obtiveram resultados positivos - frações acetato e hidroalcoólica - ocorreu testes com a dose de 0,5mg/orelha. Os animais do grupo controle negativo receberam apenas o agente flogístico, enquanto o do grupo controle positivo foi tratado topicamente com indometacina (0,5 mg/orelha), fármaco de referência. Os animais foram sacrificados, por inalação de excesso de anestésico, 6h após a indução da inflamação para a excisão de um fragmento de orelha de 6 mm de ambas as orelhas, para isso utilizou-se um punch (Fig. 13 B) e pesadas em balança analítica. A quantificação do edema foi determinada por meio da diferença de peso entre os fragmentos das orelhas esquerdas e das orelhas direitas de cada um dos animais.

Os dados foram expressos como médias \pm SEM e analisadas utilizando um ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$). O programa utilizado para computação dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0. As percentagens de inibição foram calculados de acordo com a seguinte fórmula:

$$[(\text{Média de valores de controlo de grupo} - \text{média negativa de valores do grupo tratado}) / \text{média dos valores do grupo controle negativo}] \times 100.$$



Figura 14 - Ensaio de edema de orelha. A. Aplicação 20 μ L de óleo de cróton 5% na orelha esquerda. B. Excisão de fragmento de orelha de 6 mm de diâmetro com auxílio de um punch. C. Fragmento da orelha esquerda.

Fonte: (Autor)

5.10.4 Teste de edema de orelha para óleos essenciais

O método anteriormente descrito para o ensaio de edema de orelha utilizando óleo de cróton em camundongos (TUBARO et al., 1986) foi usado igualmente para o teste de atividade anti-inflamatória do óleo essencial (O.E.) de *Allophylus racemosus* Sw., também com oito animais por grupo. Foram avaliadas doses de 0,5%, 2,5% ou 25% (v/v) em acetona do O.E.. O veículo, grupo de animais de controle negativo, recebeu apenas o agente flogístico. Como controle positivo, foram utilizados o medicamento indometacina (0,5 mg/orelha; Sigma-Aldrich, EUA) e o fitoterápico Acheflan® (camada fina /orelha, Aché, Brasil). Acheflan® é um anti-inflamatório tópico comercial, cujo princípio ativo é o O.E. de *Cordia verbenácea* DC (FERNANDES et al., 2007; CALIXTO; JR, 2008), cuja substância que apresenta a maior atividade anti-inflamatória é o α -humuleno, sendo este padronizado pelo produto em 2,3 – 2,9%. Os dados foram expressos como médias \pm SEM e analisadas utilizando ANOVA de uma via seguida pelo teste de comparação múltipla de Dunnett ($p < 0,05$). O programa utilizado para computação dos dados foi GraphPad Prism Versão 6.0.

5.11 HPLC

Para análise qualitativa e isolamento do composto de interesse foi utilizado o equipamento modulado da Shimadzu Prominence de duas bombas de fase móvel LC-20AD e degaseificador DGU-20A 3R, auto-injetor SIL-20A HT, forno para coluna CTO-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (SPD-M20A, DAD) e comunicador CBM-20^a. Utilizou-se água Milli-Q e solventes grau HPLC para análises em cromatógrafo líquido.

5.11.1 Preparo de amostras para análise em HPLC

A fração hidroalcoólica, mais ativa frente ao teste de atividade anti-inflamatória, foi submetida a análise por HPLC para a obtenção do perfil cromatográfico. Assim, pesou-se 1mg da fração hidroalcoólica, que foi diluída numa mistura de solvente ACN: H₂O (1:1), e posteriormente foi filtrada em microfiltros com membrana de poros de 0,45 µm e 13 mm de diâmetro, para eliminação de quaisquer resíduos sólidos, sendo a concentração final da solução de 1 mg/mL.

5.11.2 Obtenção do perfil cromatográfico por LC-DAD

A análise por LC-DAD da fração hidroalcoólica foi realizada utilizando-se coluna analítica de fase reversa (C18), Shim-pack CLC-ODS(M)[®] C18 Shimadzu, que apresenta 25 cm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 5 µm. As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido acético 0,1 % (v/v) e acetonitrila (ACN), utilizando-se um gradiente variando-se de 5 a 100 % de ACN em 30 min, após manter-se a 100% de ACN por mais 3 min para a limpeza da coluna. O fluxo total de fase móvel foi de 1 mL/min e o volume de amostras utilizadas nas análises foi de 10 µL.

5.11.3 Isolamento do composto de interesse por LC-DAD

O composto de interesse foi preparado numa concentração de 75mg/100µL, filtrada em microfiltros com membrana de poros de 0,45 µL e 13 mm de diâmetro, para eliminação de quaisquer resquícios sólidos.

Para que o composto de interesse fosse isolado por LC-DAD utilizando-se coluna semi-preparativa de fase reversa (C18), Shim-pack PREP-ODS Shimadzu, que apresenta 25 cm de comprimento, 20 mm de diâmetro interno e tamanho das partículas de 15 µm. As fases móveis utilizadas foram solução aquosa de ácido acético 0,1 % (v/v) e ACN, variando-se inicialmente a concentração de ACN de 15 a 35% em 30 min e após chegar a concentração com 100% de ACN, a mesma

permaneceu por 7min. O fluxo total de fase móvel foi de 9 mL/min e o volume de amostra injetado foi de 100 μ L.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

A seguir são descritos os resultados obtidos neste trabalho. Inicialmente, o estudo foi realizado com o EBEAr e; a partir dos resultados do teste anti-inflamatório, decidiu-se trabalhar com a fração hidroalcoólica, ao qual apresentou maior atividade.

6.1 TESTES DE ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

Um sintoma inflamatório clássico é o edema (aumento de volume) e o recrutamento de células inflamatórias no local da inflamação (ZHONG et al., 2016). Esta característica permitiu a criação de modelos animais para avaliar o efeito anti-edematogênico e inibição do recrutamento de células. O edema da pata induzido por carragenina e o edema de orelha utilizando óleo de cróton são ambos adequados para as avaliações das atividades anti-inflamatórias por via oral e tópico, respectivamente (CHAGAS-PAULA et al., 2011).

6.2 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA DO EXTRATO DE *Allophylus racemosus* Sw.

Após a obtenção do EBEAr e das suas frações, através do particionamento, metodologia esta que permitiu separar os constituintes do extrato em três frações, que compreendem a grupos de compostos com polaridades distintas, sendo a fração hexânica a que contém constituintes de menor polaridade, a fração acetato de polaridade intermediária e a fração hidroalcoólica com componentes de maior polaridade, foi realizado teste para atividade anti-inflamatória por via oral.

O ensaio primário mais amplamente utilizado para rastrear a atividade de agentes anti-inflamatório é o edema de pata induzido por carragenina em camundongos (CHEN; YANG; WANG, 2008), que tem sido frequentemente utilizado para avaliar o efeito antiedematogênico de produtos naturais (SANTA-CECÍLIA et al.,

2011). A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica com formação de edema acentuado resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios (OGONOWSKI et al., 1997). Segundo ROSA; WILLOUGHBY (1971), o edema provocado pela carragenina ocorre em três fases. Na primeira hora, logo após a administração da carragenina, a permeabilidade vascular é aumentada por histamina e serotonina. Na segunda hora a permeabilidade vascular aumenta devido à liberação de cinina e depois de três horas, fase de maior intensidade do edema, caracteriza a ação das prostaglandinas que são as responsáveis por efetuarem um aumento na permeabilidade capilar (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971). A resposta inflamatória é normalmente quantificada pelo aumento do tamanho da pata (edema) e é modulado por inibidores de moléculas específicas dentro da cascata inflamatória, como as drogas anti-inflamatórias não esteróide (SANTA-CECÍLIA et al., 2011), que inclui a indometacina, por exemplo, que é um bloqueador da síntese de prostaglandinas.

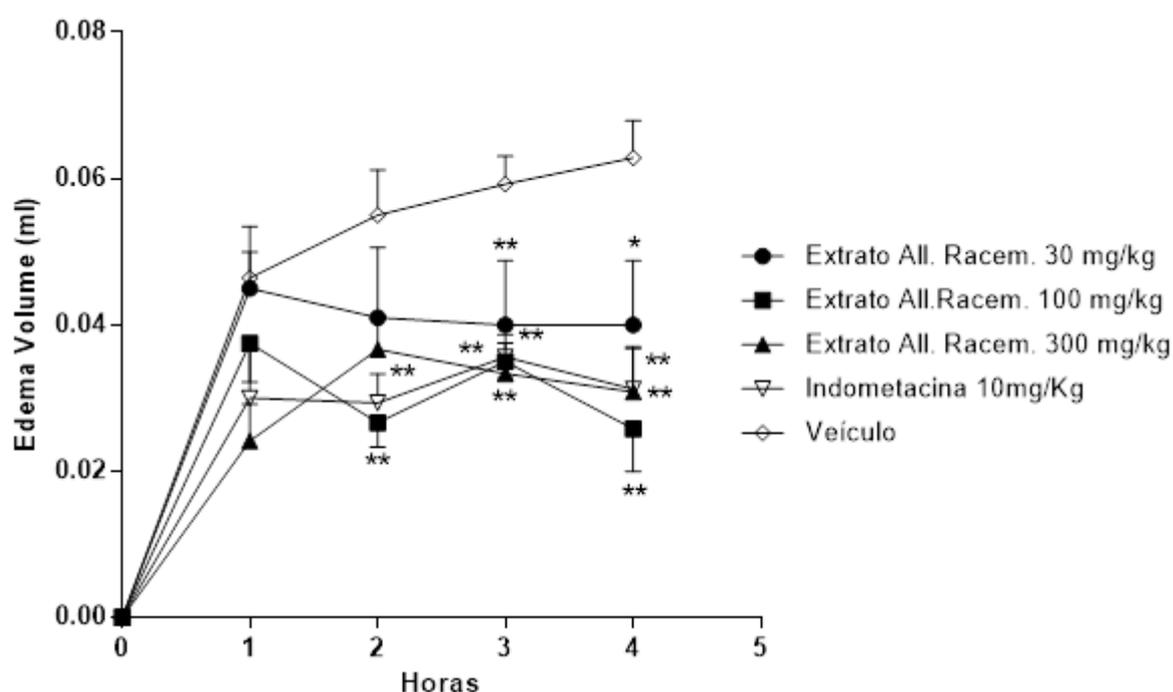


Figura 15 - Atividade anti-inflamatória do extrato bruto etanólico das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. no modelo de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, nas quatro primeiras horas experimentais.

Fonte: (Autor)

Os testes de edema de pata induzido por carragenina, após análise estatística utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0., mostraram que o EBEAr na concentração de 100mg/Kg apresentou atividade significativa frente a inflamação de 51,51%, 40,96% e 58,90% na segunda, terceira e quarta hora, respectivamente. Já os extratos brutos nas concentrações de 30 mg/Kg e 300 mg/Kg apresentaram atividade significativa frente a inflamação apenas na terceira e quarta hora. Já o padrão indometacina (10mg/Kg) apresentou reduções de 46,59%, 39,91% e 50,28% de inibição, respectivamente para as horas 2, 3 e 4, do experimento, como demonstrado na tabela 2.

Tabela 2 - Dados da porcentagem de inibição de edema de pata.

Tempo (h)	Indometacina 10mg/Kg	Extrato All. rac. 30mg/Kg	Extrato All. rac. 100mg/Kg	Extrato All. rac. 300mg/Kg
2	46,59	25,46	51,51	33,33
3	39,91	32,53	40,96	43,78
4	50,28	36,36	58,90	50,95

Fonte: (Autor)

A carragenina, um agente inflamatório, produz inflamação por liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de um edema. É possível que, assim como a indometacina, componentes deste extrato estejam inibindo a biossíntese de prostaglandinas.

6.3 TESTE DE EDEMA DE ORELHA DO EXTRATO E FRAÇÕES *Allophylus racemosus* Sw.

Após constatar a atividade anti-inflamatória através do teste de edema de pata induzido por carragenina do EBEAr, o teste de atividade inflamatória tópica foi realizado com o extrato bruto e suas frações, hexânica, acetato e hidroalcoólica, de

modo que pudesse verificar se há também atividade tópica e qual ou quais das frações possuem atividades anti-inflamatória.

Para avaliar a atividade anti-inflamatória tópica da planta em estudo usou-se o modelo de edema de orelha utilizando óleo de cróton (*Croton tiglium L.*) como agente irritante, cujo composto principal é o acetato de tetradecanoilforbol (ATF) (HECKER, 1968; RAO et al., 1993). A aplicação de óleo de cróton ou ATF purificado sobre a orelha são utilizados para avaliar os efeitos anti-inflamatórios tópicos de agentes não-esteroides e esteroides (SCHIANTARELLI et al., 1982). O edema causado pela aplicação tópica de óleo de cróton é devido a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A fisiopatologia do edema induzido pelo ATF parece ser exercida pela liberação de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina e prostaglandina (SCHIANTARELLI et al., 1982; TRONGSAKUL et al., 2003).

O teste de edema de orelha mostrou que o EBEAr., assim como no teste de atividade anti-inflamatória por via oral apresentou resultado significativo para o teste de atividade anti-inflamatória tópica, ou seja, obteve resultado de inibição significativa frente as avaliações estatísticas, reduzindo em 45,6% o edema, uma redução maior do que o controle positivo, indometacina (fármaco anti-inflamatório não-esteróide) que apresentou redução de edema de 39,7%, na concentração de 1mg/orelha. Entretanto, os valores de redução de edema tanto do EBEAr, quanto do fármaco utilizado como referência são considerados estatisticamente semelhantes através da comparação múltipla de Dunnett.

A fração hidroalcoólica mostrou atividade anti-edematogênica tópica significativa em todas as doses testadas, 0,5mg/orelha e 1mg/orelha, tendo inibição de edema de 43,2% e 38,2%, respectivamente, como pode-se observar na tabela 3. A fração acetato demonstrou efeito somente intermediário frente a inibição do edema na concentração de 1 mg/orelha, inibição de edema de 28,7%, e para a concentração de 0,5 mg/orelha não houve atividade significativa, com uma inibição de edema de 11,6%. A fração hexânica não mostrou atividade significativa na diminuição do edema induzido por óleo de cróton, na concentração de 1mg/orelha, ou seja, não houve nenhuma inibição, comparada estatisticamente com o veículo, por isso a mesma fração não foi testada na concentração de 0,5mg/orelha. Os valores da inibição estão demonstrados na tabela 3 e as figuras 16 e 17 demonstram os valores em massa da

inibição, ou não, do extrato bruto etanólico de *Allophylus racemosus* Sw. e das suas frações.

Tabela 3 - Dados da porcentagem de inibição de edema de orelha do extrato bruto etanólico e frações de *Allophylus racemosus* Sw.

Concentração	Indometacina	EBEAR	FHA	FAC	FH
1mg/orelha	39,7%	45,6%	43,2%	28,7%	0%
0,5mg/orelha	39,7%	-	38,2%	11,6%	-

Fonte: (Autor)

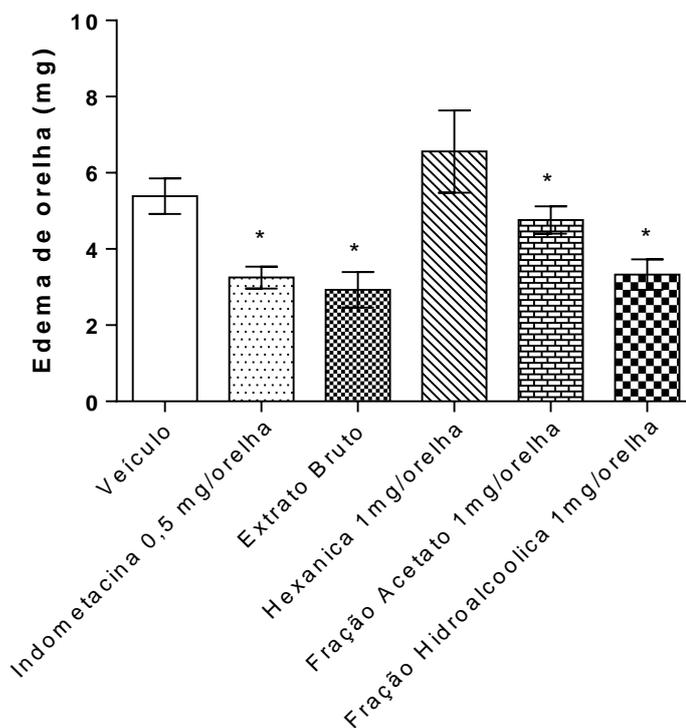


Figura 16 - Atividade anti-inflamatória do extrato bruto etanólico e das frações hexânicas, hidroalcoólica e acetato nas concentrações de 1mg/orelha de *Allophylus racemosus* Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: (Autor)

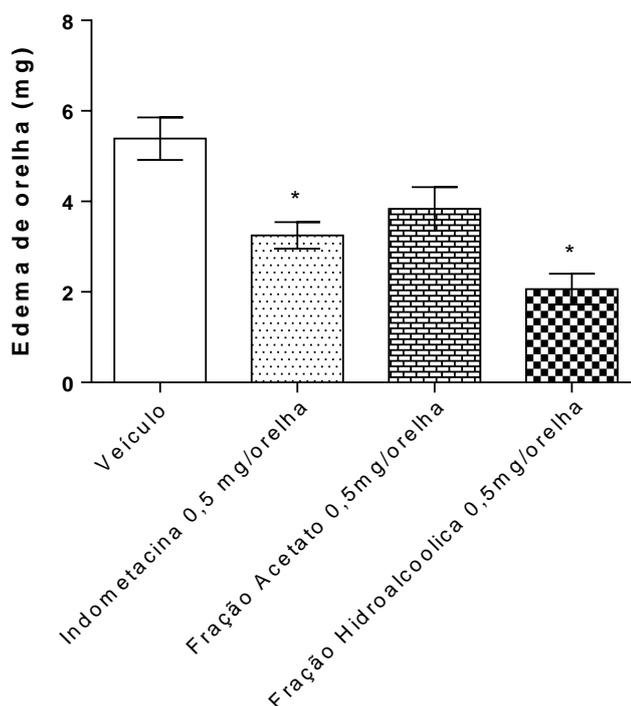


Figura 17 - Atividade anti-inflamatória das frações acetato e hidroalcoólica nas concentrações de 0,5mg/ orelha de *Allophylus racemosus* Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: (Autor)

Assim sendo, pode-se inferir que os compostos com atividade anti-inflamatória devem apresentar polaridade intermediária e/ou de alta polaridade.

6.4 TESTE DE EDEMA DE ORELHA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Allophylus racemosus* Sw.

Após a obtenção do O.E. de *Allophylus racemosus* Sw. (EBEAR) foi realizado teste para atividade anti-inflamatória tópica de edema de orelha.

O O.E. de *Allophylus racemosus* Sw. foi avaliado através do teste de edema de orelha utilizando camundongos e a análise dos resultados foi realizada pelo programa GraphPad Prism Versão 6.0. Os resultados mostraram que o O.E. de *Allophylus racemosus* Sw., apresentaram resultados estatisticamente significativos na concentração de 25% (v/v), em que o edema foi reduzido em 41,3%. Já nas

concentrações de 0,25% e 2,5% a atividade anti-inflamatória não foi estatisticamente significativa, tendo uma redução de edema de 24,8% e 2,9%, respectivamente, quando comparado com o veículo. Os controles positivos utilizados foram o medicamento indometacina e o fitomedicamento Acheflan®, em que a redução de edema foram 39,7% e 57,3%, respectivamente, como pode-se observar na tabela 4 e na figura 18.

Tabela 4 - Dados da porcentagem de inibição de edema de orelha de óleos essenciais de *Allophylus racemosus* Sw..

Acheflan®	Indometacina	O.E. 0,25%	O.E. 2,5%	O.E. 25%
57,3%	39,7%	24,8%	2,9%	41,3%

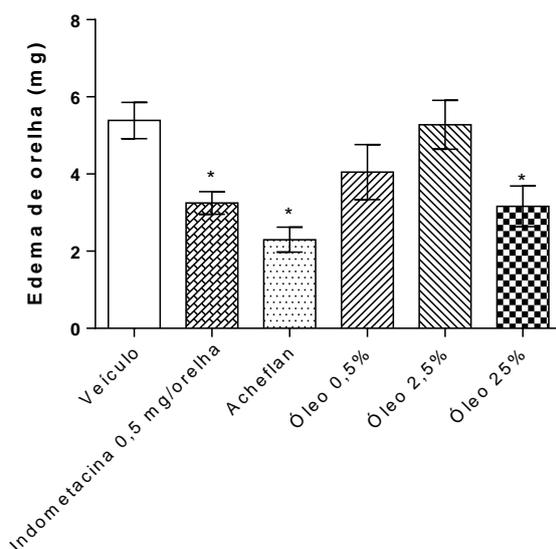


Figura 18 - Atividade anti-inflamatória das frações acetato e hidroalcoólica nas concentrações de 0,5mg/Kg de *Allophylus racemosus* Sw. no modelo de edema de orelha em camundongos.

Fonte: (Autor)

Ambos os controles positivos são fármacos anti-inflamatórios não esteroides que inibem a COX, que tem como consequência a diminuição das prostaglandinas e tromboxanos. Esta inibição afeta diretamente os efeitos cardeais clássicos da

inflamação que consiste na vermelhidão (do latim: rubor), calor, inchaço (tumor), dor e edema (TRACY, 2006).

O controle positivo, o fitomedicamento Acheflan® apresenta na sua composição (*E*)-cariofileno e α -humuleno, nas concentrações de 25,4% e 4,8%, respectivamente, sendo esses relatados na literatura como os responsáveis pela atividade anti-inflamatória do O.E. de *Cordia verbenácea* (PASSOS et al., 2004; FERNANDES et al., 2007; RODRIGUES et al., 2012). O O.E. de *Allophylus racemosus* Sw. também possui ambos os compostos, porém nas concentrações de 18,56% e 2,33%, respectivamente, assim é possível inferir que a atividade anti-inflamatória está relacionada com alguns dos principais compostos presentes no O.E. da planta em estudo, mesmo que em uma concentração inferior ao padrão.

Além disso, relatórios científicos sugerem que a presença de γ -muuroleno (composto de maior concentração no O.E. de *Allophylus racemosus* Sw., 30,66%) tem importância na atividade anti-inflamatória, uma vez que existem na literatura relatos O.E. da casca da fruta de *Garcinia brasiliensis*, por exemplo, que apresentam o composto γ -muuroleno atuando contra o processo inflamatório (MARTINS et al., 2008; QUEIROZ et al., 2014). O biciclogermacreno, composto com a terceira maior concentração do O.E. *Allophylus racemosus* Sw., 17,38%, tem a sua atividade também correlacionada com a resposta ao processo inflamatório por indução de carragenina (QUEIROZ et al., 2014).

No entanto, avaliar a atividade anti-inflamatória de compostos individuais dos O.E. é difícil, uma vez que há poucos estudos individualizados, mas o potencial anti-inflamatório dos terpenos tem sido amplamente descrito (SÁ; ANDRADE; DE SOUSA, 2015).

6.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS DE *Allophylus racemosus* Sw.

As folhas frescas hidrodestiladas de *Allophylus racemosus* Sw. proporcionou óleos amarelo e viscoso. Os óleos essenciais foram analisados por GC-MS (coluna capilar RTX-5). Os compostos individuais foram designados de acordo com os seus índices de Kovats (IK) em comparação com os espectros de massa obtidos na

literatura (ADAMS, 2009). O cromatograma com a composição química do O.E. de *Allophylus racemosus* Sw. e a quantidade relativa de cada composto identificado são mostrados na figura 19 e Tabela 5, respectivamente.

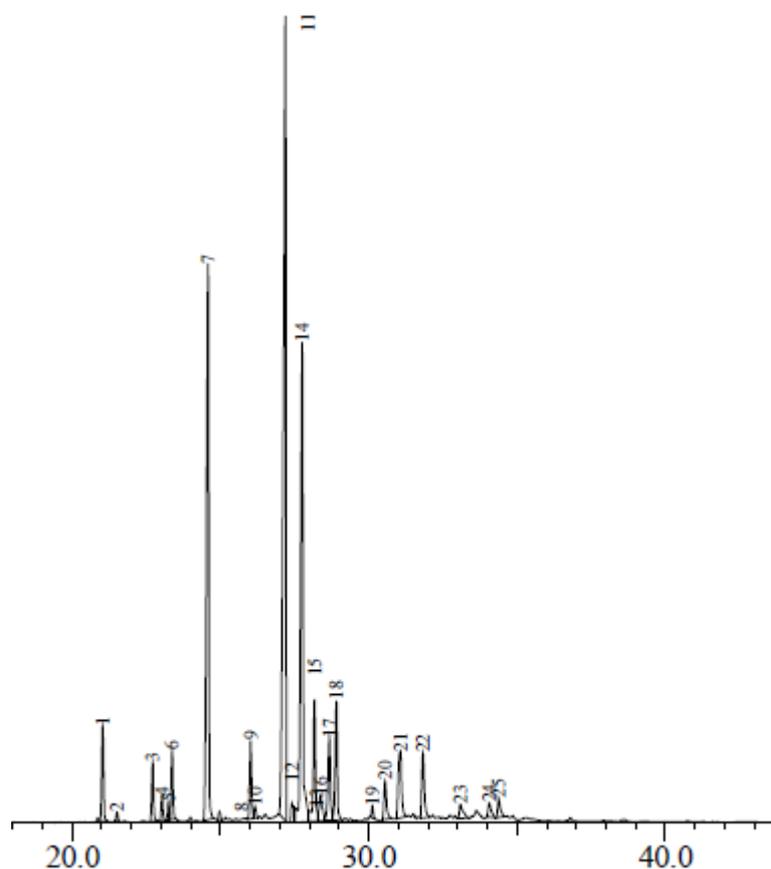


Figura 19 - Cromatograma com a composição química do Óleo Essencial de *Allophylus racemosus* Sw.

Fonte: (Autor)

No total, foram identificados 20 compostos nos óleos das folhas de *Allophylus racemosus* Sw. que juntos representaram aproximadamente 92% da composição total de óleo. O O.E. é composto na sua maioria por γ -muurroleno (30,66%), (*E*)-cariofileno (18,56%), Biciclogermacreno (17,38%) e Germacreno A (4,09%), sendo os sesquiterpenos seus principais constituintes, como se observa na tabela 5. Na comparação com o único relato encontrado na literatura de O.E. do gênero *Allophylus*, na composição das folhas e flores de *Allophylus africanus* há divergências na composição das substâncias encontradas nessa espécie e isso pode ser devido a

razões endêmicas e/ou ao tipo de análise empregada (BALOGUN; OLADOSU; LIU, 2014).

Tabela 5 - Composição química do óleo essencial obtido de *Allophylus racemosus* Sw..

Compostos	IK	Porcentagem relativa (%)
δ-elemeno	1338	2,56
α-cubebeno	1351	0,21
α-copaeno	1376	1,64
β-cubebeno	1388	0,49
β-bourboneno	1388	0,69
β-elemeno	1390	1,90
(E)-cariofileno	1419	18,56
β-copaeno	1432	0,22
α-humuleno	1454	2,33
(E)-β-farneseno	1456	0,37
γ-muuroleno	1479	30,66
(E)-muurolo-4(14),5-diene	1493	0,49
Biciclogermacreno	1500	17,38
germacreno A	1509	4,09
(Z)-γ-bisaboleno	1515	1,32
δ-cadinene	1523	3,15
germacreno B	1561	0,30
(E)-nerolidol	1563	1,45
Guaiol	1600	3,41
Bulnesol	1671	0,79
TOTAL	-	92,01

Fonte: (Autor)

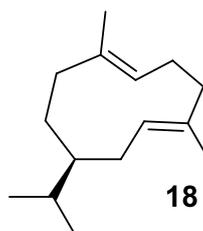
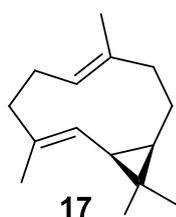
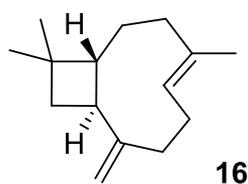
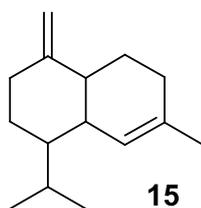


Figura 20 - Compostos majoritários do Óleo Essencial de *Allophylus racemosus* Sw.: γ-muuroleno (15), (E)-cariofileno (16), biciclogermacreno (17) e germacreno A (18).

Fonte: (Autor)

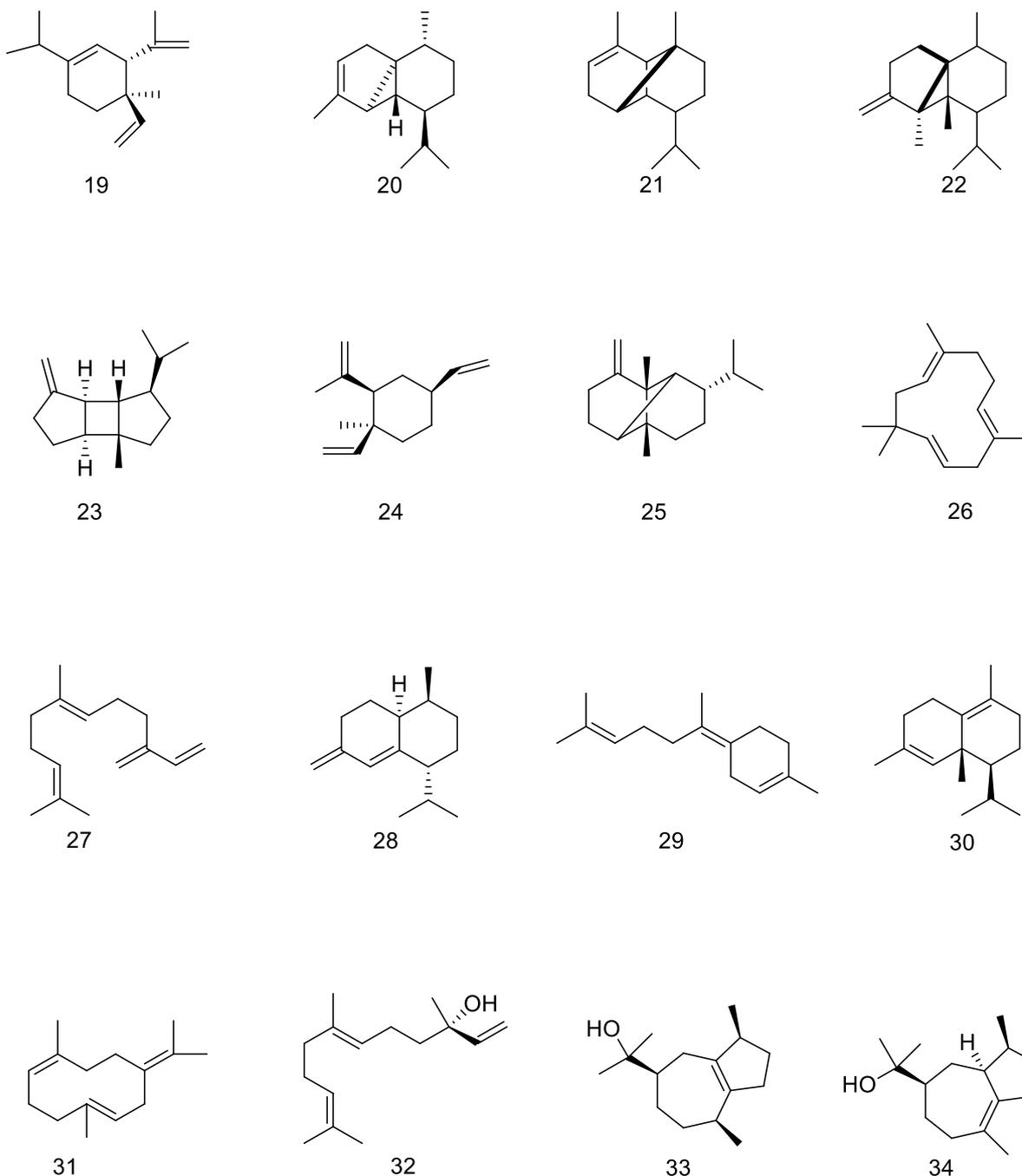


Figura 21 - Demais compostos do Óleo essencial de *Allophylus racemosus* Sw.

Fonte: (Autor)

Legenda: δ -elemeno (19); α -cubebeno (20); α -copaeno (21); β -cubebeno (22); β -bourboneno (23); β -elemeno (24); β -copaeno (25); α -humuleno (26); (*E*)- β -farneseno (27); (*E*)-muurolo-4(14),5-diene (28); (*Z*)- γ -bisaboleno (29); δ -cadinene; (30); germacreno B (31); (*E*)-nerolidol (32); Guaiol (33) e Bulnesol (34).

6.6 ANÁLISE DA FRAÇÃO ATIVA POR LC-DAD

A fração hidroalcoólica de *Allophylus racemosus* Sw. que se mostrou a mais ativa frente aos testes de atividade anti-inflamatória foi submetida à análise por LC-DAD em que foi possível obter o perfil cromatográfico.

O cromatograma bidimensional obtido por LC-DAD apresenta gráficos que relacionam o comprimento (ou faixa de comprimento) de onda em nm, em que são detectados cada um dos compostos eluídos na corrida cromatográfica em função dos seus tempos de retenção (t_R), em min. As diferentes cores apresentadas indicam a diferença de intensidade de detecção das substâncias eluídas, desta forma, é possível observar na figura 22 que a substância de interesse apresenta um pico com tempo de retenção de 11 min.

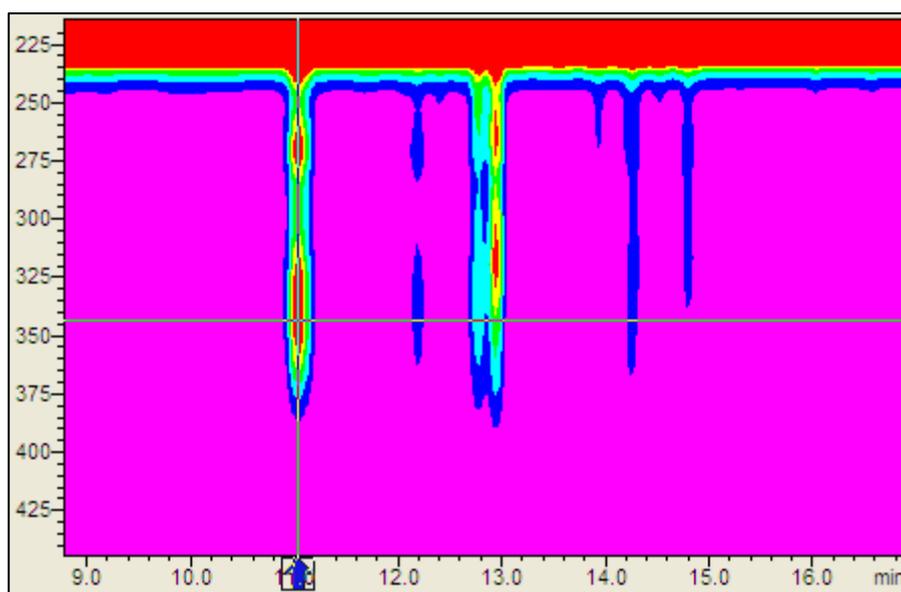


Figura 22 - Perfis cromatográficos obtidos da fração hidroalcoólica.
Fonte: (Autor)

Para uma análise mais detalhada, determinou-se um comprimento de onda (254 nm) em que o pico de interesse pudesse ser visualizado num cromatograma unidimensional (figura 23). Desta forma, foi possível confirmar a presença do pico com $t_R = 11$ min no cromatograma da amostra analisada.

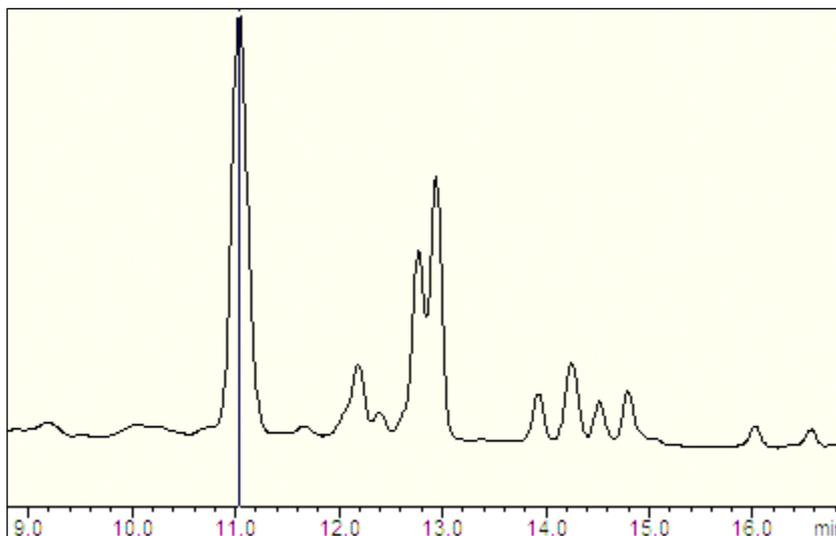


Figura 23 - Perfil cromatográfico obtido por HPLC-UV-DAD em 254 nm mostrando a presença dos compostos da fração hidroalcoólica de *Allophylus racemosus Sw.*

Fonte: (Autor)

Pode-se observar que os cromatogramas exibidos nas figuras 22 e 23 apresentam grande quantidade de picos, uma vez que normalmente amostras de produtos naturais apresentam grande complexidade. É importante ressaltar que a utilização do detector de arranjo de diodos permite detectar somente substâncias que absorvam radiações UV, ou seja, somente aquelas que apresentem grupos cromóforos em suas estruturas são detectadas. Assim, entende-se que somente as substâncias com grupos cromóforos foram detectadas na amostra analisada por LC-DAD.

A análise da fração hidroalcoólica por LC-DAD permitiu obter ainda o espectro de absorção no UV para o pico de interesse onde se observou o comprimento de onda de máxima absorção característico da substância, sendo $\lambda_{\text{máx}} = 269$ e 325 nm.

6.7 ISOLAMENTO DO COMPOSTO A POR LC-DAD

O composto de interesse designado como o pico de $t_R = 11$ min descritos na análise da seção anterior, pode ser isolado a partir da fração hidroalcoólica. Apesar de se utilizar coluna com a mesma fase estacionária, as mesmas fases móveis e o

mesmo gradiente de fases móveis do método analítico, o perfil cromatográfico apresentado na corrida semi-preparativa mostrou-se diferente da analítica, isso ocorre, pois a coluna semi-preparativa utilizada no isolamento possui dimensões bastante distintas da anterior, além de ter um fluxo muito maior de fase móvel.

O cromatograma unidimensional mostrado na figura 24, demonstra a separação do composto de interesse. É possível observar que o perfil cromatográfico obtido apresenta tempo de retenção do pico de interesse de $t_R \approx 13,89$ min e ao verificar a curva de absorção do UV (figura 25) pode-se concluir ser o mesmo composto da curva analítica.

Pelo fato da curva apresentar o mesmo perfil de absorção em toda extensão do pico de interesse, é possível inferir sobre a pureza do composto ali separados (considerando-se substâncias detectáveis por DAD).

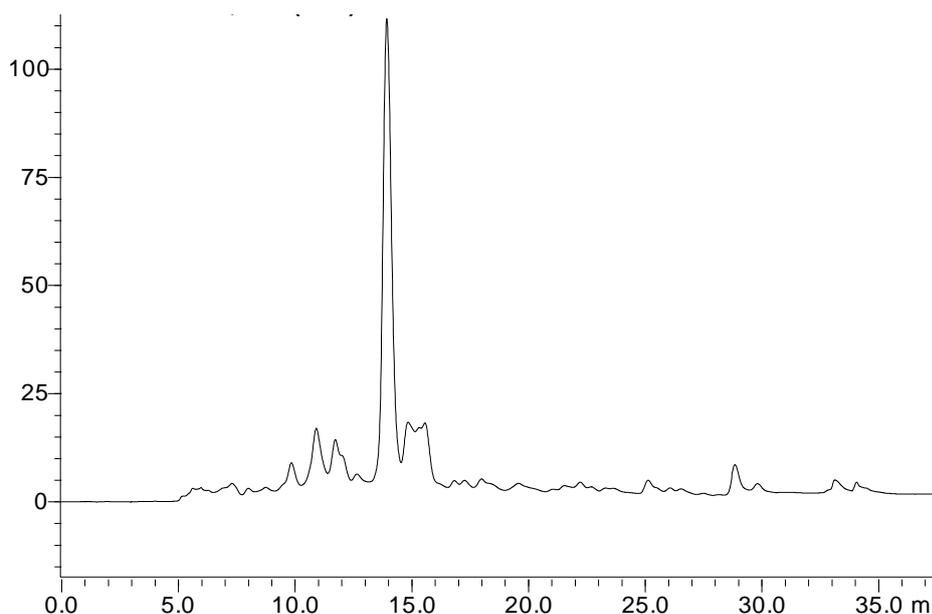


Figura 24 - Perfil cromatográfico unidimensional obtido por HPLC-UV-DAD em 254 nm mostrando a presença do composto de interesse com $t_R \approx 13,89$ min.
Fonte: (Autor)

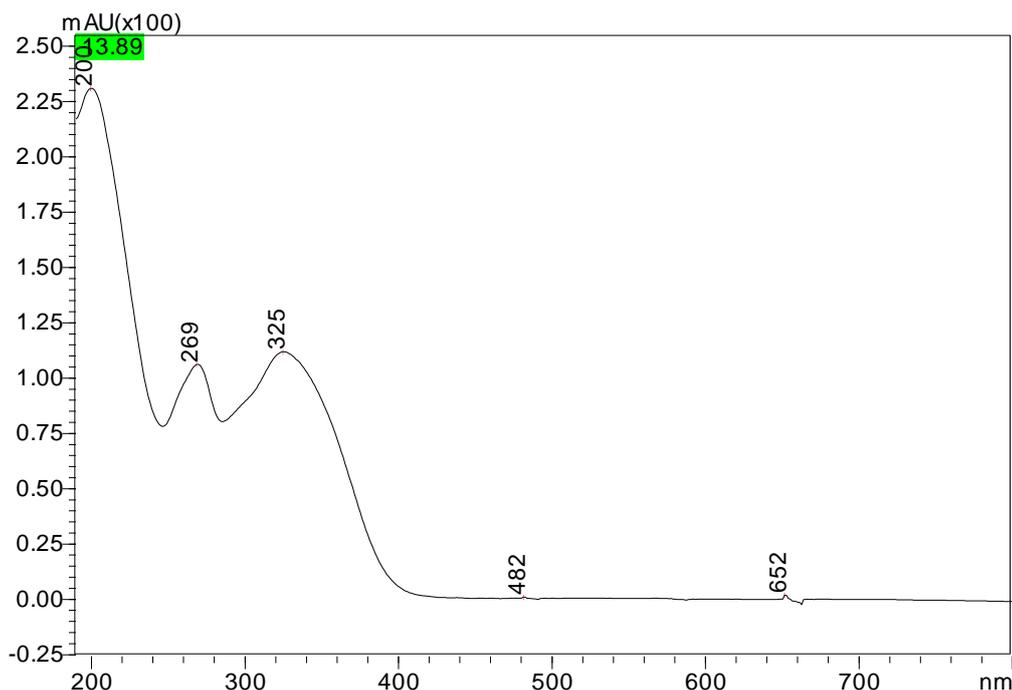


Figura 25 - Curva de absorção no UV para o composto de interesse (tR ≈ 13,89min).
Fonte: (Autor)

Após a completa eliminação do solvente, obteve-se 8 mg do composto de interesse, na forma de um sólido amarelo, que foi isolado por meio de quatro injeções da fração hidroalcoólica no LC-UV-DAD no modo semipreparativo. Esse composto foi utilizado para obtenção dos espectros de RMN ^1H e ^{13}C e bidimensionais (COSY, HMQC e HSQC). Os espectros estão sendo analisados para identificação da substância isolada. Porém com os dados de cromatografia de alta eficiência acoplada a UV-DAD pode-se sugerir que é um flavonoide, com λ_{max} de 269 e 325 nm (figura 26).

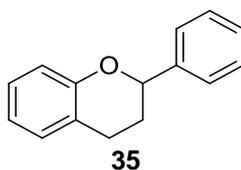


Figura 26 - Núcleo de um flavonoide.
Fonte: (Autor)

Além disso, pelo espectro obtido por LC-MS foi possível propor o núcleo desse flavonóide como sendo da apigenina (figura 27), devido ao pico base de 269, no modo negativo, como se observa na figura 28, comparando com o perfil cromatográfico do padrão da apigenina, figura 29, assim como em relatos da literatura (ANA PLAZONIĆ

et al., 2009; KANG et al., 2016; SCHUTZ et al., 2004; SINGH et al., 2016; TERPINC et al., 2016). O espectro da substância de interesse, também apresenta pico em 383 no modo negativo, que é característico de uma aglicona ligada a uma pentose (massa= 132) com perda de uma molécula de água (massa= 18) [Agli + pentose – H₂O]⁻, conforme descrito na literatura (COUTINHO et al., 2016; PINHEIRO; JUSTINO, 2012; TAHIR et al., 2012). Portanto, pode-se sugerir que a substância isolada se trata de um composto derivado de uma apigenina ligada a uma pentose como proposto na figura 30. A figura propõe que a substância isolada, com base nos dados de espectrometria de massas, quando apresenta uma *m/z* 383 pode-se tratar da molécula com a perda de uma molécula de água e um próton [M-H₂O-H⁺], já a *m/z* 269 pode ser da molécula com a perda da pentose. Vale ressaltar, que o local exato da substituição pela pentose só poderá ser determinado pela interpretação dos resultados de RMN, que se encontra em andamento.

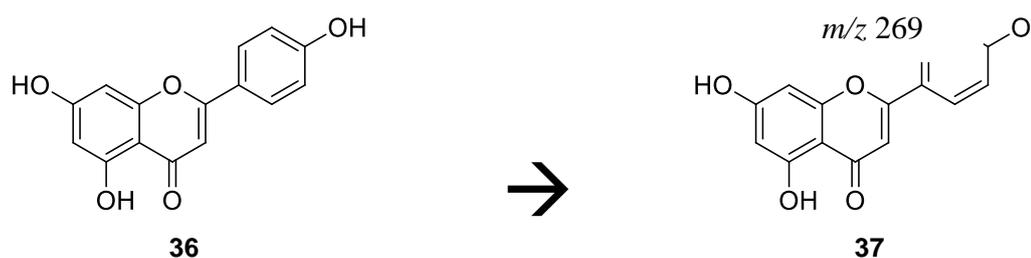


Figura 27 – Estrutura molecular da apigenina (36) e de uma de suas bases conjugadas (37).

Fonte: (Autor)

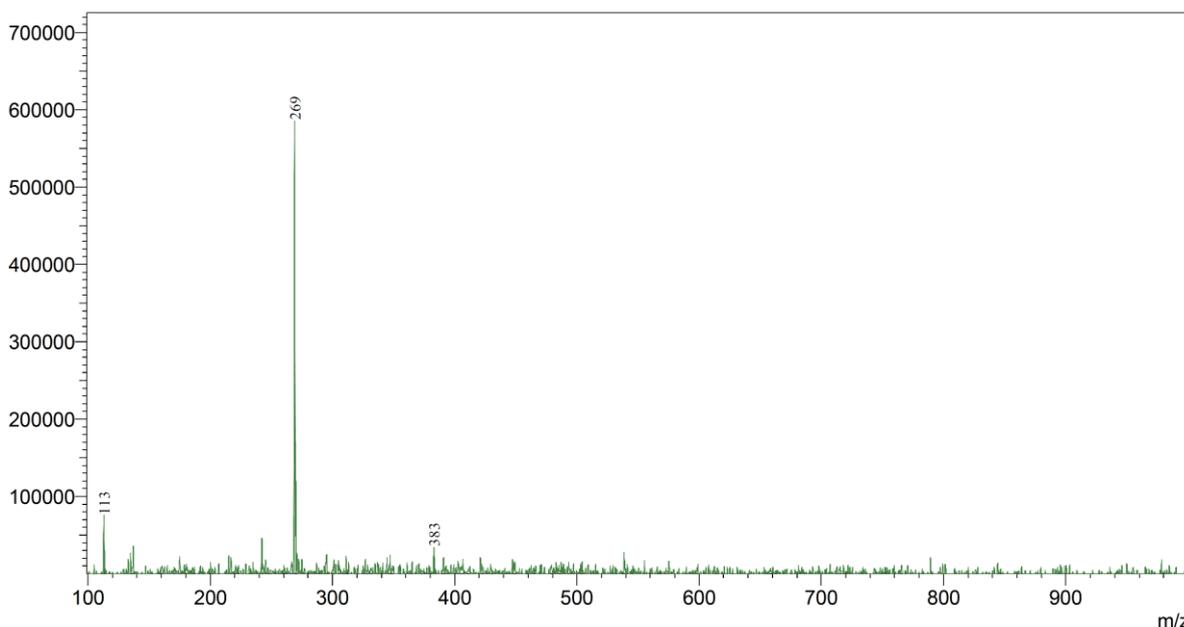


Figura 28 - Espectro de massas obtido no modo negativo para a substância de interesse.

Fonte: (Autor)

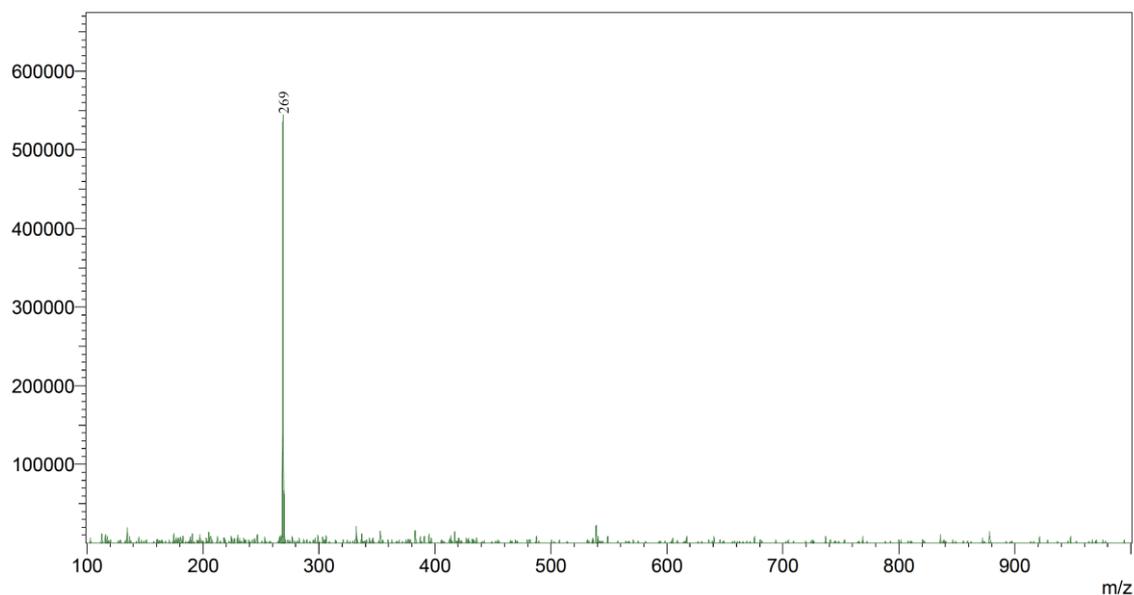


Figura 29 - Espectro de massas obtido no modo negativo para o padrão apigenina.
Fonte: (Autor)

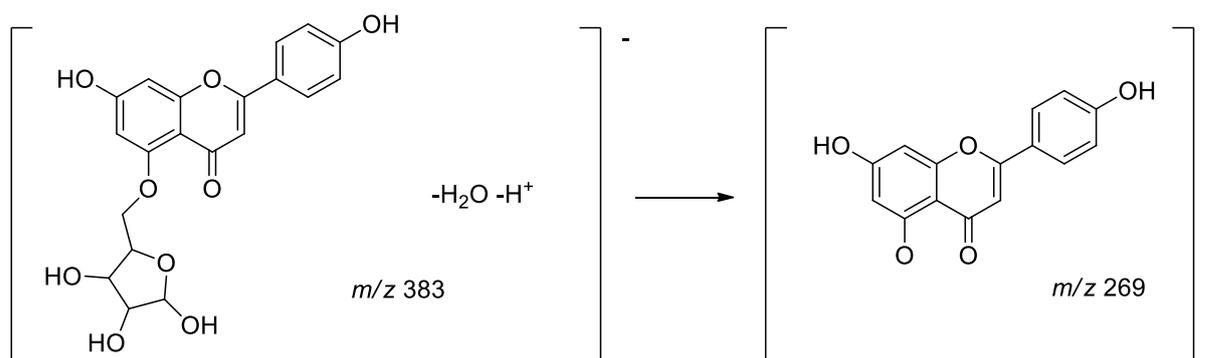


Figura 30 – Proposta da substância isolada com base nos dados de espectrometria de massas.
Fonte: (Autor)

7 CONCLUSÃO

Na literatura não há nenhum relato sobre quaisquer atividades biológicas e tampouco de estudos fitoquímico da espécie *Allophylus racemosus* Sw., trazendo assim resultados inéditos para este representante do gênero da família Sapindaceae, mostrando sua potencialidade frente as atividades anti-inflamatórias.

Para a preparação do EBEAr, ao final de todo processo, obteve-se um rendimento de 7,39%. Já para o O.E., ao final do procedimento, se adquiriu-se 1mL.

O estudo da atividade anti-inflamatória do extrato bruto etanólico de *Allophylus racemosus* Sw., através do teste de edema de pata induzido por carragenina, mostrou atividade estatisticamente significativa frente aos valores do padrão (indometacina - reduções de 46,59%, 39,91% e 50,28% de inibição, respectivamente para as horas 2, 3 e 4) na concentração de 100mg/Kg com redução da inflamação de 51,51%, 40,96% e 58,90% na segunda, terceira e quarta hora, respectivamente. Nas concentrações de 30 mg/Kg e 300 mg/Kg apresentaram atividade significativa frente a inflamação apenas na terceira (32,53% e 43,78%) e quarta hora (36,36% e 50,95%). Com isso, através do particionamento e consequente obtenção da fração hexânica, fração acetato e fração hidroalcoólica, o teste de edema de orelha foi realizado e constatou que a fração hidroalcoólica apresentou melhor atividade anti-inflamatória (inibição de edema de 43,2% e 38,2%, nas concentrações de 0,5mg/orelha e 1mg/orelha, respectivamente) e a fração hexânica não apresentou nenhuma atividade (inibição de edema de 0%), assim pode-se inferir que a substância ativa está relacionada a moléculas com polaridade alta. E através da fração hidroalcoólica e utilizando técnicas como LC-DAD e LC-MS, foi possível isolar um composto que apresenta o núcleo de uma apigenina ligada a uma pentose.

Os óleos essenciais de *Allophylus racemosus* Sw. também apresentaram resultados estatisticamente significativos para a atividade anti-inflamatória (redução de edema de 41,3% na concentração de 25% (v/v)) e pode-se identificar os compostos existentes no mesmo, onde se observou que apresenta os dois compostos responsáveis pela atividade anti-inflamatória do fitomedicamento Acheflan[®] utilizado como padrão, (*E*)- cariofileno e α -humuleno.

Os testes farmacológicos realizados (teste de edema de pata e teste de edema de orelha) determinaram o perfil farmacológico dos extratos brutos etanólico quanto a

atividade anti-inflamatória, mostrando que foram muito significativos, em se tratando de extratos brutos, que são matrizes orgânicas complexas. Portanto, o teste com substâncias isoladas provenientes dos constituintes de *Allophylus racemosus* Sw. poderá proporcionar substâncias com perfil anti-inflamatório, uma vez que os seus extratos apresentaram atividade.

REFERÊNCIAS

ABDELLATIF, K. R. A. et al. Synthesis, cyclooxygenase inhibition, anti-inflammatory evaluation and ulcerogenic liability of new 1,3,5-triarylpyrazoline and 1,5-diarylpyrazole derivatives as selective COX-2 inhibitors. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 406–412, 2016.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4th. ed. USA: Allured Corp, 2009.

ADEYEMI, T. O.; OGUNDIPE, O. T.; OLOWOKUDEJO, J. D. Distribution and DNA conservation of Sapindaceae Juss. in Western Africa. **International Journal of Botany**, v. 8, n. 1, p. 31–37, 2012.

ANKAD, G. M. et al. Total Polyphenols, Antioxidant and Antimicrobial Activity of Leaves and Stem Bark Extracts of *Allophylus cobbe* (L.) Raeusch. **Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences**, v. 86, n. 1, p. 145–149, 2016.

BALOGUN, S. O.; OLADOSU, I. A.; LIU, Z. Chemical Compositions and Antioxidant Potential of Essential Oils from Leaves and Flowers of *Allophylus africanus*. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 17, n. 5, p. 769–775, 2014.

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

BESSA, T.; TERRONES, M.G.H.; SANTOS, D.Q. Avaliação fitotóxica e identificação de metabólitos secundários da raiz de *Cenchrus echinatus*. **Horizonte Científico**, v.1, n.1, p. 1–17, 2007.

CALIXTO, J. B.; JR, J. M. S. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v. 78, n. 1, p. 98–106, 2008.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kB (NF-kB). **Planta medica**, v. 69, n.1, p. 973–983, 2003.

CARDINAL, S. et al. Anti-inflammatory properties of quebecol and its derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 26, n. 2, p. 440–444, 2016.

CHAGAS-PAULA, D. A. et al. Chlorogenic acids from *Tithonia diversifolia* demonstrate better anti-inflammatory effect than indomethacin and its sesquiterpene lactones. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 136, n. 2, p. 355–362, 2011.

CHEN, L-G.; YANG, L-L.; WANG, C-C. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 688–693, 2008.

COELHO, R. L. G. **Estudos Sistemáticos das Espécies Neotropicais de *Allophylus L. (Sapindaceae)***. 2014. 449f. Tese (Doutorado em Biologia Celular) - Instituto de biologia, Unicamp, Campinas, 2014.

COUTINHO, D. J. G. et al. Fatty-Acid Composition of Seeds and Chemotaxonomic Evaluation of Sixteen Sapindaceae Species. v. 12, p. 1271–1280, 2015.

COUTINHO, I. D. et al. Metabolite profiling of sugarcane genotypes and identification of flavonoid glycosides and phenolic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.64, n. 21, p.4198-4206, 2016.

CRĂCIUN, L. R. et al. Lupeol as anti-inflammatory compound tested on Balb/c - TPA Model. **Journal of Agroalimentary Processes and Technologies**, v. 17, n. 2, p. 157–162, 2011.

CRONQUIST, A. **An integrated system of classification of flowering plants**. New York: Columbia University Press, 1981.

CUNHA, L. C. et al. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2 A, p. 403–411, 2009.

DAVID, J. P.; DOS SANTOS, I. D.; DAVID, J. M. A new sesquiterpene from the fruits of *Allophylus laevigatus*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 7-8, p. 795–798, 2004.

DHARMANI, P. et al. *Allophylus serratus*: A plant with potential anti-ulcerogenic activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 3, p. 361–366, 2005.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of pathology**, v. 104, n. 1, p. 15–29, 1971.

DÍAZ, M. et al. First record of L-quebrachitol in *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Carbohydrate Research**, v. 343, n. 15, p. 2699–2700, 2008.

DÍAZ, M. et al. Differential Deterrent Activity of Natural Products Isolated from *Allophylus edulis* (Sapindaceae). **Advances in Biological Chemistry**, v. 04, n. 2, p. 168–179, 2014.

FALEIRO, M. L.; MIGUEL, M. G. Use of Essential Oils and Their Components against Multidrug-Resistant Bacteria. In: RAI, M. K.; **Fighting Multidrug Resistance with Herbal Extracts, Essential Oils and Their Components**. London: Elsevier, 2013. cap. 6, p. 65-94.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

GARDI, C. et al. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150–157, 2015.

HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. **Goodman & Gilman As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 10^o ed., Dallas, McGraw Hill, 2005.

HECKER, E. Cocarcinogenic principles from the seed oil of *Croton tiglium* and from other Euphorbiaceae. **Cancer Research**, v. 28, n. 11, p. 2338–2349, 1968.

JUDD, W. S. et al. **Plants systematics: a phylogenetic approach**. 2nd. ed. Massachusetts: Sinauer Associates, 2002.

KANG, J. et al. Identification and characterization of phenolic compounds in hydromethanolic extracts of sorghum wholegrains by LC-ESI-MSn. **Food Chemistry**, v. 211, p. 215–226, 2016.

KATZUNG, B. G.; MASTERS, S. B.; TREVOR, A. J. **Farmacologia Basica & Clinica**. 12. ed. AMGH Editora Ltda, 2013.

KUMAR, M. et al. Anti-osteoporotic constituents from Indian medicinal plants. **Phytomedicine**, v. 17, n. 13, p. 993–999, 2010.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498–512, 2002.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Quimica Nova**, v. 25, n. 3, p. 429–438, 2002.

MARTINS, F. T. et al. Composition, and Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of the Volatile Oil from the Fruit Peel of *Garcinia brasiliensis*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 5, n. 2, p. 251–258, 2008.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: A short review. **Molecules**, v. 15, n. 12, p. 9252–9287, 2010.

MILLER, R. E.; TUCK, K. L. Reports on the distribution of aromatic cyanogenic glycosides in Australian tropical rainforest tree species of the Lauraceae and Sapindaceae. **Phytochemistry**, v. 92, p. 146–152, 2013.

NETO, G. G.; SANTANA, S. R.; SILVA, J. V. B. DA. Notas etnobotânicas de espécies de Sapindaceae Jussieu. **Acta Botanica Brasilica**, v. 14, n. 3, p. 327–334, 2000.

OGONOWSKI, A. A. et al. Antiinflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 280, n. 2, p. 846–53, 1997.

OLADOSU, I. A.; BALOGUN, S. O.; ADEMOWO, G. O. Phytochemical screening, antimalarial and histopathological studies of *Allophylus africanus* and *Allophylus benthamii*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 11, n. 4, p. 371–376, 2013.

OLADOSU, I. A.; BALOGUN, S. O.; LIU, Z. Q. Chemical constituents of *Allophylus africanus*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 13, n. 2, p. 0133–0141, 2015.

OLIVA-HERNÁNDEZ, Y. et al. Evaluación del efecto antiinflamatorio de un extracto orgánico de *Allophylus cominia* (L) Sw. sobre la actividad de COX-2 y FLA-2s. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 12, n. 2, p. 150–153, 2013.

OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, n. 1, p. 170–179, 2012.

PASSOS, G. F. et al. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **Journal of immunology**, v. 172, n. 3, p. 1839–47, 2004.

PLAZONIĆ, A et al. Identification and quantification of flavonoids and phenolic acids in burr parsley (*caucalis platycarpus* L.), using high-performance liquid chromatography with diode array detection and electrospray ionization mass spectrometry. **Molecules**, v. 14, n. 7, p. 2466–2490, 2009.

PENNACCHIO, M. et al. Interesting biological activities from plants traditionally used by Native Australians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 3, p. 597–601, 2005.

PIMENTA, A. F. G. et al. Economia verde, sustentabilidade e as plantas medicinais de Minas Gerais. 2012.

PINHEIRO, P.F; JUSTINO, G.C. Structural analysis of flavonoids and related compounds—a review of spectroscopic applications. **Phytochemicals – A Global Perspective of Their Role in Nutrition and Health**, p. 33–56, 2012.

PINTO, A. C. et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Quimica Nova**, v. 25, n. SUPPL. 1, p. 45–61, 2002.

PRIYA, E. S.; SELVAN, P. S.; TAMILSELVAN, R. Phytochemical Invesetigation of *Allophylus serratus* Kurz Leaves by UV and GC-MS Analysis. **Research Journal of Phytochemistry**, v. 6, n 1, p. 17–24, 2012.

QUEIROZ, J. C. C. et al. Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive effects of the essential oil from leaves of *xylopia laevigata* in experimental models. **Scientific World Journal**, p. 1-11, 2014.

RAMOS-LOPEZ, M. A. et al. Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils Anti-inflammatory Activity of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v 23, p. 38-44, 2011.

RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.

RAO, T. S. et al. Comparative evaluation of arachidonicacid (aa) and

tétradecanoylphirbolacetate (tpa) – induced dermal inflammation. **Plenun Publishing Corporation**, v. 17, n. 6, p. 723-741, 1993.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy research**, v. 4, n. 3, p. 161–165, 2012.

RODRIGUES, M. V. N. et al. O emprego de técnicas hífenadas no estudo de plantas medicinais. **MultiCiência : Revista interdisciplinar dos centros e núcleos da Unicamp, Campinas**, n. 7, 2006.

RODRIGUEZ, T. V. et al. Detection and Determination of Chemical Groups in an Extract of *Allophylus cominia* (L.). **Journal of herbal pharmacotherapy**, v. 5, n. 4, p. 31–38, 2005.

ROSA, M. DI; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 23, n. 4, p. 297–298, 1971.

ROSADO, A. et al. Lista de espécies de Sapindaceae para um remanescente de Floresta Estacional Semidecidual no sul do Brasil: Estação Ecológica do Caiuá. **Revista Brasileira de Biociências**, v 12, n. 3, p. 148–157, 2014.

SÁ, R. C. S.; ANDRADE, L. N.; DE SOUSA, D. P. Sesquiterpenes from Essential Oils and Anti-Inflammatory Activity. **Natural Product Communications**, v. 10, n. 10, p. 1767–1774, 2015.

SANTA-CECÍLIA, F. V. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Garcinia brasiliensis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 467–473, 2011.

SCHIANTARELLI, P. et al. Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxicam. **Arzneimittel Forschung**, v. 32, n. 3, p. 230–235, 1982.

SCHUTZ, K. et al. Identification and Quantification of Caffeoylquinic Acids and Flavonoids from Artichoke (*Cynara scolymus* L.) Heads, Juice, and Pomace by HPLC-DAD-ESI/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 13, p. 4090–4096, 2004.

SIEGLOCH, A. M.; MARCHIORI, J. N. C.; SANTOS, S. R. Anatomia do lenho de *Allophylus guaraniticus* (st.-hil.) radlk. (sapindaceae). **Balduinia**, n. 39, p. 19–23,

2013.

SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F.A.A; CONCEIÇÃO, G. M.. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n.2; p. 1–17, 2010.

SINGH, A. et al. Comparative profiling of phenolic compounds from different plant parts of six Terminalia species by liquid chromatography–tandem mass spectrometry with chemometric analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 87, p. 236–246, 2016.

SINGH, R. K. et al. Anti-inflammatory effect of (+)-pinitol. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 168–170, 2001.

SOLIMAN, K. F. A. et al. Diurnal variation in the phlogogenic response of rats to inflammatory agents. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 35, n. 6, p. 388–389, 1983.

SOMNER, G.V.; FERRUCCI, M.S.; ACEVEDO-RODRÍGUEZ, P.; COELHO, R.L.G. Allophylus in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB111553>>. Acesso em: 11 Jan. 2016.

SU, K.-Y. et al. 3,4-Dihydroxytoluene, a metabolite of rutin, inhibits inflammatory responses in lipopolysaccharide-activated macrophages by reducing the activation of NF- κ B signaling. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 14–21, p. 1-9, 2014.

SPRENGEL-LIMA,C; REZENDE, A. A. Sapindaceae do noroeste paulista : lista de espécies e chave de identificação baseada em caracteres vegetativos. **Biota Neotropica**, v. 13, n. 2, p. 270–282, 2013.

TAHIR, N. I. et al. Characterization of apigenin and luteolin derivatives from oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) Leaf using LC-ESI-MS/MS. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 45, p. 11201–11210, 2012.

TERPINC, P. et al. LC-MS analysis of phenolic compounds and antioxidant activity of buckwheat at different stages of malting. **Food Chemistry**, v. 210, p. 9–17, 2016.

TIRLONI, C. A. S. et al. Evaluation of the antioxidant activity, antimicrobial effect and acute toxicity of leaves from *Allophylus edulis*(A.St.-Hil., A. Juss. Cambess &.) Hieron. ex Niederl. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 9, n. 11, p. 353–362, 2015.

TRACY, R. P. The Five Cardinal Signs of Inflammation: Calor, Dolor, Rubor, Tumor ... and Penuria (Apologies to Aulus Cornelius Celsus, De medicina, c. A.D. 25). **Medical Sciences**, v. 61A, n. 10, p. 1051–1052, 2006.

TRONGSAKUL, S. et al. The analgesic, antipyretic and anti-inflammatory activity of *Diospyros variegata* Kruz. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, n. 2-3, p. 221–225, 2003.

TUBARO, A. et al. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, n. 3-4, p. 347–349, 1986.

VIEGAS JR., C.; BOLZANI, V. DA S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–337, 2006.

WINTER, C.; RISKY, E.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544–547, 1982.

XIANG-YUN, Z.; XIANG-HAI, C; XIAS-DONG, L. Chemical constituents of *Allophylus longipes*. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 10, n. 1, p. 36–39, 2012.

ZHONG, L. et al. Evaluation of the anti-inflammatory effects of volatile oils from processed products of *Angelica sinensis* radix by GC–MS-based metabolomics. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 191, p. 195–205, 2016.