



Fundação Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul



**Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal**

Etnofarmacologia da utilização da casca da raiz do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.) como anti-inflamatória e anti-hiperalgésica

Ellen Pereira da Silva Maciel

**Campo Grande-MS
2018**

Fundação Universidade Federal de Mato Grosso Do Sul

Instituto de Biociências
Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal

Etnofarmacologia da utilização da casca da raiz do pequi (*Caryocar brasiliense* *Cambess.*) como anti-inflamatória e anti-hiperalgésica

Dissertação apresentada a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como parte da exigência do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal para obtenção do título de Mestre.

Aluna: Ellen Pereira da Silva Maciel.
Orientador: Carlos Alexandre Carollo
Coorientadora: Ieda Maria Bortolotto

Campo Grande-MS
2018

Agradecimentos

Primeiramente meus agradecimentos a Deus, pelo dom da vida e por ter colocado pessoas no meu caminho que foram verdadeiros amigos.

A minha família, meus pais Salvadora e Arnaldo pelos ensinamentos, educação, apoio e por acreditarem na minha capacidade, por me incentivar nos momentos de desanimo.

A minha irmã Raquel, sobrinha Lívia e cunhado Thiago por serem tão especiais e trazerem alegria em todos os momentos.

Aos meus quatro irmãos: Milton Augusto pela inspiração, Robert por me ensinar determinação, Gerson por me ensinar resiliência e Cristina por me ensinar coragem, mesmo de longe torceram sempre pelo meu sucesso.

A meu querido namorado Guilherme Dalponti pelo apoiou com muito humor sempre trazia uma piada para descontrair e pelo incentivo em todos os momentos.

A minha amiga e colega de moradia Vivian, por tantos ensinamentos de autoconhecimento e aulas de yoga.

As minhas queridas amigas Darlene, Vanessa, Katyuce, Samara, Patrícia, com carinho me receberam e com carinho sempre estiveram dispostas a passarem ensinamentos valiosos.

As técnicas Amanda e Nadla pelo maravilhoso trabalho e sempre estarem dispostas a compartilhar o conhecimento e conselhos.

A querida professora Denise, pelas explicações em qualquer momento, sempre muito disposta, as palavras de incentivo.

A todos os integrantes do LAPNEM, por se tornarem uma verdadeira família por todos os momentos compartilhados.

Aos meus colegas de turma, que se tornaram grandes amigos, e por todos momentos que passamos juntos, principalmente: Analice, Renata, Aline, Ana Maria, Diego, Jean e Márcia.

Ao meu orientador Carlos Alexandre que abriu as portas do conhecimento, sempre com muita empolgação inspirando e ensinando principalmente a fazer ciência.

A minha querida coorientadora Ieda Maria apaixonada pelo que faz passando seus conhecimentos sobre Etnobotânica com muita dedicação e amor.

Agradeço a todo o pessoal da Botânica técnicos e professores que de alguma forma estiveram envolvidos no meu trabalho.

Agradeço ao pessoal do laboratório de Biofisiopharmacologia (UFMS) a professora Mônica, a Iluska e a Jésica, por todo o apoio com os ensaios com animais e ensinamentos.

Agradeço a CAPES pelo apoio financeiro que incentiva a promoção do conhecimento e ciência.

E finalmente agradeço a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul por proporcionar a oportunidade para que eu pudesse adquirir conhecimentos e viver mais essa etapa da vida acadêmica.

Ninguém vence sozinho! Obrigada a todos!

Dedicatória

Dedico este trabalho a Anita Barbosa Tinoco (*in memorian*), mulher, mãe, amiga, como muitas mulheres deste país que lutam por melhores condições de vida para seus filhos, que assim inspiram a todos.

Sumário

Capítulo I	11
1.Introdução	11
1.1 Aspectos históricos.....	11
1.2. Aspectos legais.....	13
1.3. Avanços tecnológicos e desenvolvimento de produtos naturais	13
1.4. Aspectos gerais de inflamação.....	15
1.5. Família Caryocaraceae: aspectos morfológicos e etnofarmacológicos	16
1.6. Referências bibliográficas	21
2. Objetivos	30
2.1. Objetivos Específicos.....	30
Capítulo II	31
1. Introdução	33
2. Materiais e métodos	34
2.1. Levantamento dos dados etnofarmacológicos	34
2.3. Coleta do material vegetal.....	34
2.4. Preparo do extrato vegetal e teste de estabilidade dos compostos.....	34
2.5. Perfil químico do EACb.....	35
2.6. Quantificação de compostos fenólicos e taninos totais do extrato aquoso da casca da raiz de <i>C. brasiliense</i> (EACb).....	36
2.7. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH).....	36
2.8. Ensaios biológicos.....	37
2.9. Avaliação de toxicidade aguda <i>in vivo</i> em <i>Caenorhabditis elegans</i>	37
2.11. Avaliação anti-inflamatória	38
2.11.1. Avaliação do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre de edema de pata induzido por Carragenina	38
2.11.2. Avaliação do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre influxo leucocitário induzido por Carragenina	38
2.12. Avaliação anti-hiperalgésica	39
2.12.1. Avaliação do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre contorção abdominal induzida pelo ácido acético	39
2.13. Análise estatística	39
3. Resultados.....	40
3.1. Levantamento dos dados etnofarmacológicos	40
3.2. Teste de estabilidade durante diferentes tempos de extração	40
3.4. Analise do perfil químico.....	43

3.5. Quantificação de compostos fenólicos e taninos totais do extrato aquoso de <i>C. brasiliense</i> (EACb)	49
3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH) do extrato aquoso de <i>C. brasiliense</i> (EACb)	49
3.7. Ensaio biológico.....	49
3.8. Efeito de toxicidade do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) <i>in vivo</i> em <i>Caenorhabditis elegans</i>.....	49
3.9. Efeito anti-inflamatório.....	50
3.9.1. Efeito do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre o edema de pata induzido por carragenina	50
3.9.2. Efeito do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre o infiltrado leucocitário para a cavidade peritoneal de camundongos induzido por carragenina ..	51
3.10. Efeito anti-hiperalgésico.....	52
3.10.1. Efeito do extrato aquoso de <i>Caryocar brasiliense</i> (EACb) sobre a contorção abdominal induzida pelo ácido acético	52
4. Discussão	54
5. Conclusão.....	59
6. Agradecimentos.....	60
7. Referências bibliográficas	61
8. Anexos	68
8.2. Roteiro de entrevista	69
8.3. Autorização SISBio	71
7.4. Certificado do comitê de ética de animais (CEUA).....	72

Resumo

A Etnofarmacologia é a ciência que estuda metabólitos bioativos produzidos por espécies vegetais tradicionalmente utilizadas pelo homem no tratamento de doenças. No presente estudo investigamos o potencial farmacológico das raízes do pequi (*Caryocar brasiliense*), uma espécie arbórea utilizada pelas comunidades locais tanto na alimentação como no tratamento de dores e inflamações. Apesar da vasta utilização popular do pequi, pouco se conhece sobre sua composição química e potencial medicinal. Assim, tendo como premissa a utilização popular, o objetivo deste trabalho foi investigar a estabilidade e identificar os metabólitos secundários da casca da raiz do pequi, bem como quantificar compostos fenólicos e taninos totais, e avaliar biologicamente *in vivo* a toxicidade aguda em *Caenorhabditis elegans* e os efeitos anti-inflamatórios e anti-hiperalgésicos em *Mus musculus*. O extrato aquoso da casca das raízes foi obtido de forma similar à utilização popular por extração aquosa a frio. O perfil químico foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjos de diodo e espectrômetro de massas (CLAE-DAD-EM) e a quantificação de compostos fenólicos e taninos totais foi realizado por espectofotometria pelo método Folin-ciocalteau e capacidade de sequestrar radicais livres pelo método DPPH. Os efeitos de toxicidade do EACb foram avaliadas *in vivo* em nematoides *C. elegans*, os efeitos das atividades anti-inflamatória (edema de pata e influxo leucocitário) e anti-hiperalgésica (contorção abdominal) foram avaliadas em camundongos machos (18-30 g) da linhagem Swiss utilizando as doses de 1, 16 e 40 mg/Kg do extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* (EACb). O EACb mostrou estabilidade em solução aquosa, sendo identificado os compostos derivados de ácido gálico, elágico, taninos hidrolisáveis e saponinas triterpenicas. O EACb não demonstrou efeitos tóxicos em *C. elegans* nas concentrações (7,5 –1000 µg / mL). A dose compatível com a popular de 16 mg/Kg apresentou potencial nas atividade anti-inflamatória e anti-hiperalgésica. Assim, pela primeira vez conseguimos replicar o método popular, validando a utilização popular em tratamentos de dor e inflamações, demonstrando que o resultado pode ser relacionado ao perfil químico encontrado no EACb.

Palavras-chave: medicina popular, taninos hidrolisáveis, saponinas triterpênicas, CLAE-DAD-EM.

Abstract

Based on traditional knowledge Ethnopharmacology studies biologically active plant metabolites. In the present study, we investigated the medicinal use of pequi (*Caryocar brasiliense*), a tree species commonly used both as a food source and on the treatment of pain and inflammation. Despite wide popular use, there is low information reported for its chemical composition and biological properties. Therefore, our aim was to investigate the stability and to identify the secondary metabolites of pequi roots, as well as the *in vivo* effects of toxicity on *Caenorhabditis elegans*, and antihyperalgesic and anti-inflammatory effects in *Mus musculus*. The aqueous extract, obtained from *C. brasiliensis* roots using similar popular application, was analyzed by high performance liquid chromatography coupled to diode-array detector and mass spectrometry (HLC-DAD-MS) and its chemical profile was determined. The *in vivo* ant-inflammatory and antihyperalgesic effect was evaluated using male mice (Swiss lineage) weighting between 18-30 g and three doses (1, 16, and 40 mg/Kg) of aqueous extract from *C. brasiliense*. The extract showed stability in aqueous solution and Triterpene saponins, gallic and ellagic acid derivatives, and hydrolysable tannins were identified from the aqueous *C. brasiliensis* extract (WECb). The WECb did not show toxicity in *C. elegans* at the concentrations (7,5 –1000 µg/mL), presented anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activity, at the concentration of 16 mg / kg dose compatible with the popular use. Thus, for the first time we have been able to replicate the popular method, validating the popular use in pain and inflammation treatments, demonstrating that the result can be related to the chemical profile found in EACb

Key-words: Folk medicine, hidrolisable tannins, triterpenic saponin, HLC-DAD-MS.

Capítulo I

1. Introdução

1.1 Aspectos históricos

O ser humano utiliza recursos naturais para fins medicinais desde tempos imemoriais. Documentações antigas, como papiros egípcios, guardam conhecimentos de como eram sanados os problemas de saúde cotidianos, utilizando plantas e outros recursos do ambiente (Corleto, 1993). O conhecimento sobre as plantas e seus usos era baseado em observações, magias ou crenças religiosas (Sipos et al., 2004).

O papiro de Ebers de 1555 a.C., relata a medicina egípcia e do leste do Mediterrâneo, descrevendo a preparação e utilização de medicamentos de origem vegetal, animal e mineral (Pasquale, 1984). Nesse papiro, por exemplo, foi descrito o ópio como sedativo para crianças (Duarte, 2005).

Carl Linnaeus já havia utilizado o conhecimento dos povos tradicionais no estudo da botânica durante o século 19, àquela época, seus discípulos enviados às colônias europeias no novo mundo recorriam aos conhecimentos dos povos nativos, documentando a utilização das plantas em rituais religiosos, cura e também espécies alucinógenas, levando ao reconhecimento de novas espécies de plantas (Davis, 1995).

O conhecimento empírico gerado pelos povos tradicionais deu origem à Etnobiologia, ciência responsável pelo estudo das inter-relações entre homem e meio ambiente, incluindo toda sociedade que desenvolva algum conhecimento a respeito da biologia e requer ferramentas interdisciplinares para o estudo de culturas complexas (Posey 1987).

O termo Etnobotânica foi cunhado por Harshberger em 1896, em uma pesquisa de arqueologia no Canyon Mancos, Colorado (USA), ao revelar a presença de plantas durante escavações (Hamilton et al., 2003). Harshberger relacionou o estudo etnobotânico com aspectos antropológicos, determinando aspectos de uma cultura a partir das plantas que eram utilizadas, o local de origem das plantas e do povo estudado, as rotas de comércio ou outras atividades que estabeleciam relações com a utilização de plantas (Harshberger, 1896; Davis, 1995; Gurib-Fakim, 2006).

Atualmente a Etnobotânica é reconhecida como a ramificação da Etnobiologia que estuda, interpreta e resgata as inter-relações dos povos com a diversidade de espécies vegetais (Prance, 1991), possuindo importância na perpetuação e validação dos conhecimentos populares sobre a biodiversidade, e compilando de forma escrita sistematizada os conhecimentos tradicionais, os quais tem origem na cultura popular e são sujeitos a perdas (Leonti, 2011). Schultes (1994) definiu o termo etnobotânica como o estudo dos usos tecnológicos, manipulação, classificação, sistema agrícola, técnicas de conservação e economia geral e ainda relatou a importância de plantas para sociedades iletradas, ressaltando o seu papel na conservação, tanto cultural quanto ambiental.

Os estudos antes restritos a comunidades isoladas e autossustentáveis, com descrição de listas de espécies e suas utilidades, na sociedade moderna começaram a levar em consideração as interações ecológicas e complexas da sociedade em transformação, visando resgatar essas interações geradoras de conhecimento (Ford, 1978; Hurrel e Pochettino, 2014). Por exemplo, em ambientes urbanos atuais a interação entre as culturas trazidas por imigrantes e povos originários pode resultar em novas formas de utilização de plantas nativas, assim como à inserção espécies trazidas pelos imigrantes (Hurrel e Pochettino, 2014).

O termo Etnofarmacologia foi utilizado pela primeira vez em 1967 no título de um livro a respeito de alucinógenos (*Ethnopharmacological search for psychoactive Drugs* – Busca etnofarmacológica para drogas psicoativas) (Heinrich, 2010). Atualmente a Etnofarmacologia é reconhecida como uma sub-área da etnobotânica, a qual é responsável por investigar substâncias potencialmente ativas baseados em antecedentes de utilização popular, criando hipóteses e testando sua eficácia, e baseando em consideração os aspectos socioambientais (Etikin 2001, Elisabetsky 2003, Albuquerque e Hanazaki, 2006).

A Etnofarmacologia é uma ciência interdisciplinar que interpreta o conhecimento das pessoas sobre doenças, os nomes populares das plantas utilizadas e as variáveis socioambientais, compreendendo os critérios de seleção das espécies de plantas utilizadas e enfermidades citadas por um determinado grupo de seres pessoas (Heinrich, 2003; Heinrich et al., 2006).

1.2. Aspectos legais

Em 1992, a Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento (ECO 92) incorporou em todos os países responsabilidades como desenvolver ações mais sustentáveis, discutindo o respeito, integridade cultural, direitos das comunidades indígenas e proteção dos recursos naturais locais (Brasil, 1995).

No Brasil foi criada a lei 13.123 de 20 de maio de 2015 que regula o acesso ao patrimônio genético, bem como, a repartição de benefícios econômicos gerados a partir de produtos regionais. Esta lei ainda, prevê: a proteção do conhecimento tradicional; e define: conhecimento tradicional de origem não identificável como o conhecimento tradicional em que não há a possibilidade de vincular a sua origem. No artigo 6º cria o conselho de gestão do patrimônio genético (CGEN), responsável por coordenar e implementar políticas de gestão do acesso ao patrimônio genético e conhecimento tradicional associado à repartição de benefícios.

Junto a estas previsões, os estudos passaram a ser normatizados e assim ocorrendo um progresso nos estudos de Etnobiologia, com as políticas de normatização evoluindo de forma conjunta às pesquisas na área. Essas medidas visaram preservar o direito do conhecimento e do ambiente nativo de povos tradicionais brasileiros reiterando que a preservação da biodiversidade cultural, tradicional garante a descoberta de novos produtos com potencial medicinal (Cordell, 2000).

1.3. Avanços tecnológicos e desenvolvimento de produtos naturais

O isolamento e síntese de compostos evoluíram a partir do avanço nas áreas de química e física, assim, os extratos vegetais naturais foram colocados em segundo plano (Saad et al., 2009). Entretanto, isto vem se modificando, a interação sinérgica que ocorre entre compostos presentes em extratos vegetais está se apresentando mais efetiva, apresentando menos efeitos colaterais em comparação aos compostos isolados (Yuan et al., 2017).

Fitoterápicos ou fármacos derivados de produtos naturais são originados a partir de estudos interdisciplinares. Entre os anos de 2000 e 2003 cerca de 30 novos medicamentos e compostos baseados em medicinas tradicionais foram pesquisados

e validados quanto a atividades anticancerígena, anti-infeciosa, imunossupressora e no combate a doenças neurológicas (Butler, 2004).

Os produtos naturais bioativos são em grande maioria produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, envolvendo compostos expressos como resposta ao ambiente, podendo exercer atividades como atração de polinizadores ou na defesa contra patógenos, entre outros (Simões et al., 2016). Os compostos do metabolismo secundário são organizados em diferentes categorias, dependendo da rota biossintética precursora ou semelhanças das estruturas químicas, tendo como principais classes os alcaloides, flavonoides, taninos, saponinas, quinonas e terpenos (Simões et al, 2016).

A descoberta de compostos a partir de produtos naturais cresceu a partir do desenvolvimento do acoplamento de técnicas como a espectrometria de massas, usadas para mensurar a massa molecular e revelar informações estruturais das moléculas orgânicas (Lanças, 2009).

A espectrometria de massas é baseada na geração de íons, que são posteriormente separados por um campo elétrico ou magnético em alto vácuo e então finalizando com a detecção dos íons. O acoplamento da espectrometria de massas a técnicas de separação, como a cromatografia líquida de alta eficiência, vem sendo aplicada com sucesso na separação de compostos a partir de matrizes complexas com variação de polaridade de média a alta e pouca volatilidade (Dewick, 2009).

Na cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao espetrômetro de massas com ionização por eletrospray (IES) (CLAE-EM), os íons são gerados à pressão atmosférica ao invés de vácuo. A amostra é misturada a um solvente e então é pressurizada formando um spray que pode ser ionizado com cargas negativas ou positivas gerando íons moleculares, moléculas protonadas ou desprotonadas que são analisadas em um analisador de massas que separa os íons de acordo com a relação massa/carga (m/z) transformando em sinais elétricos sendo possível a análise dos dados e gerar fórmulas moleculares que permitem a identificação de compostos (Crotti et al., 2006). Estas novas técnicas modernas de identificação e separação de compostos, associadas ao estudo dos conhecimentos tradicionais propiciaram grande avanço na descoberta de novos candidatos a fármacos (Butler, 2004; Campbell et al., 2017).

1.4. Aspectos gerais de inflamação

No tratamento de processos inflamatórios e dores inflamatórias são utilizados comumente medicamentos não esteroidais (AINEs), porém estes fármacos são responsáveis por diversos efeitos colaterais (Batlouni, 2010). Os AINEs atuam na inibição da enzima ciclo-oxigense (COX), dentre diversas funções desta enzima, atua na proteção da mucosa gástrica.

O processo inflamatório é uma reação natural do sistema imunológico de um organismo em resposta a injurias no organismo, apresentando sinais clássicos como edema, dor, rubor, calor e vermelhidão também chamada de inflamação aguda. Caso estes sintomas não sejam solucionados pode acarretar em uma inflamação crônica (Rankin, 2004).

Durante a inflamação aguda ocorrem eventos característicos, como os eventos vasculares. No evento vascular a ação de mediadores pré-estocados como aminas vasoativas, histamina e serotonina, e de cininas como a bradicinina e mediadores biológicos como óxido nítrico (NO) dão início ao processo inflamatório propiciando a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, extravasando proteínas e promovendo o edema (Bohm, 1977). As prostaglandinas juntamente com interleucinas, aminas vasoativas e bradicininas aumentam a permeabilidade e atuam na sensibilização de neurônios periféricos causando hiperalgesia (Balestieri, 2006).

No evento celular, células do sistema imune são recrutadas até o local da inflamação, principalmente as células polimorfonucleares, por meio do evento de adesão e rolamento que ocorre no endotélio vascular (Ley et al., 2007).

Durante o processo inflamatório em resposta a um estímulo, a enzima fosfolipase A₂ hidrolisa os fosfolípideos presentes na membrana das células, liberando ácido araquidônico no citoplasma que serve de substrato para duas vias enzimáticas a ciclo-oxigenase (COX) e a lipo-oxigenase (LOX) que geram os eicosanoides.

Pela via da COX são geradas as prostaglandinas (PG) que atuam na regulação das respostas do sistema imune, tais como pressão sanguínea, integridade gastrointestinal e fertilidade (Legler et al., 2010). Durante os processos inflamatórios as PGs aumentam a dilatação arterial e atuam na dor, por estimular neurônios sensoriais periféricos (Ricciotti e Fitzgerald, 2011).

Já na via da LOX são gerados os leucotrienos (LTB), responsáveis principalmente por estimular a quimiotaxia de neutrófilos, liberação de mediadores, citocinas pró-inflamatórias como interleucina (IL-6) e vasoconstrição (Busse, 1998; Bray, 1986).

Durante os processos inflamatórios ocorrem ainda a liberação de mediadores químicos e o influxo de células induzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α (Kraychete et al., 2006), espécies reativas de oxigênio, prostaglandinas, leucotrienos, bradicinina e histamina (Dray, 1995), entre outras substâncias que levam a sensibilização dos neurônios periféricos ou nociceptores, causando dor inflamatória (Wright, 1999).

1.5. Família Caryocaraceae: aspectos morfológicos e etnofarmacológicos

A família Caryocaraceae é encontrada em quase todos os países Latino-Americanos, no Sudeste Brasileiro até a Costa Rica. Normalmente tem hábito de crescimento arbóreo, ocorrendo raramente como arbustos ou subarbustos (Dickson, 1990). É constituída por apenas dois gêneros *Anthodiscus* e *Caryocar*, formada no total por 25 espécies.

Esta família apresenta como características morfológicas gerais: estípulas caducas ou ausentes; folhas pecioladas, trifolioladas, opostas ou alternas e margens geralmente serreadas, dentadas ou crenadas; flores em racemos terminais, bissexuais e actinomorfas, filetes soldados na base formando um anel; ovário súpero; fruto do tipo drupa indeiscente, com mesocarpo carnoso, endocarpo duro, lenhoso ou espinhoso externamente (Ramos et al., 2015).

O gênero *Caryocar* apresenta 16 espécies em sua maioria arbórea e encontradas em áreas de cerrado, caatinga, floresta Amazônica e mata Atlântica (Prance e Silva 1973). Dentre elas o pequi, *Caryocar brasiliense* Cambess., espécie nativa do Brasil é encontrada nas fitofisionomias do cerrado (Silva e Batalha 2010), nas regiões Norte, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (Almeida e Silva, 1994).

O pequi é uma espécie arbórea que atinge mais de sete metros de altura dependendo do ambiente que ocupa, de folhas compostas trifolioladas e filotaxia oposta, apresenta inflorescência do tipo racemos corimbosos com 1 a 30 flores agrupadas e fruto comestível tipo drupoide de coloração esverdeada. É uma espécie

hermafrodita que apresenta reprodução cruzada e necessita de agentes polinizadores para a fecundação. Floração e frutificação ocorrem de setembro a fevereiro e seus frutos e castanha são muito utilizados pela fauna e também muito utilizados pelo ser humano na culinária (Araújo, 1995; Almeida e Silva, 1994).

A etimologia dos nomes vem de “Cara” do grego Caryon (núcleo ou noz) e “Kara” (cabeça) devido o formato do fruto e o epíteto específico “*brasiliense*” é devido a espécie ser originária do Brasil. Popularmente é conhecido como pequi que é pronunciado em tupi *py*=(casca) e *qui*=(espinho) (Carvalho et al., 2015).

O pequi é amplamente explorado, desde os frutos que são consumidos em pratos típicos, bebidas como licores, preparação de derivados como farinha, o óleo na culinária e uso tópico e oral para diversas finalidades na medicina alternativa (Almeida et al, 1998).

Encontramos na literatura alguns dos relatos da utilização de *C. brasiliense* na medicina alternativa, como o uso das folhas infusas para tratar problemas ligados à maternidade, ciclo menstrual (Almeida et al, 1994), as sementes como afrodisíaco (Mendes e Carlini 2007) e problemas respiratórios (Monteles e Pinheiro, 2007; Souza Ferreira et al., 2015), o óleo das sementes para asma, bronquite, resfriados e coqueluche (Rodrigues e Carvalho, 2001) e o fruto macerado para afecções da pele (Messias et al., 2015) e para tratar obesidade, diabetes, hipertensão e labirintite (Briesky et al., 2012), sendo uma espécie amplamente utilizada possuindo grande importância social nas localidades em que ocorre.

Em estudos farmacológicos publicados até o ano de 2018, verificados na base de dados Scifinder, três espécies da família Caryocaraceae: *Caryocar brasiliense*, *Caryocar coriaceum* e *Caryocar vilosum* foram pesquisadas, dando suporte para alguns dos usos populares já descritos (Tabela 1). A atividade antioxidante foi a mais reportada com 12 citações, em seguida da atividade anti-inflamatória com 4 citações e a parte mais estudada são os frutos e o óleo dos frutos que popularmente é um produto comercializado e de fácil acesso as populações.

As principais classes de compostos já identificados para algumas espécies do gênero como *C. brasiliense*, *C. coriaceum*, *C. glabrum* e *C. vilosum*, são compostos fenólicos, compostos triterpênicos, ácidos graxos, derivados de ácido gálico (Roesler

et al., 2008; Figueiredo et al., 2016; Magid et al., 2008; Magid et al., 2006; Marx et al., 1997).

Nas folhas de *C. brasiliense* foi relatada a presença de taninos, esteroides, triterpenoides, flavonoides, alcaloides e cumarinas, sendo os flavonoides de grande interesse farmacológico por apresentar propriedades anti-inflamatórias, antiespasmódica, antioxidante e antialérgica, entre outros (Coutinho, 2009; Lopes et al. 2011).

Um trabalho realizado por Ascari e colaboradores (2010), identificou 12 metabólitos secundários na região do epicarpo e mesocarpo externo, entre estes o ácido gálico, ácido quínico e quercetina que possuem ação contra algumas doenças crônicas e degenerativas como, artrite reumatoide, doença de Parkinson e doença de Alzheimer, além de serem utilizados como matéria prima para a indústria cosmética (Roesler et al., 2008).

Também são relatados diversos carotenoides responsáveis pela coloração amarela no fruto de pequi, como: β -caroteno, α -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina (Ramos et al. 2001). Esses compostos possuem ação antioxidante, proporcionando redução do risco de câncer e acidentes vasculares (Mathews-Roth, 1991).

Dentre a ampla quantidade de estudos encontrados para a espécie, poucos trabalhos focaram na avaliação das raízes do pequi. Rezende et al. (2011), realizaram um estudo para testar o potencial alelopático de extratos de caule e raízes do pequi na inibição da germinação do capim colonião (*Megathyrsus maximus*, Poaceae), uma planta invasora. Os resultados foram positivos, ocorrendo efeito inibitório da germinação das sementes, causada pela presença de metabólitos como saponinas, taninos, cumarinas e alcaloides. Porém, não há descrições mais detalhadas destes compostos e não foram encontradas avaliações do potencial farmacológico da casca da raiz do pequi.

Existem relatos de uso popular da casca raiz do pequi na região de Campo Grande - MS, onde preparados da casca da raiz são utilizados no tratamento de dor causada por inflamações. Neste contexto, consideramos relevante a pesquisa etnofarmacológica das raízes, visando o enriquecimento de dados sobre o potencial farmacológico do pequi e resgate deste conhecimento, que parece estar

desaparecendo ou esquecido pelas comunidades. Para isto, este trabalho propõe a realização de testes anti-inflamatórios e da atividade anti-hiperalgésica, utilizando extrato aquoso da casca das raízes de *Caryocar brasiliense* Cambess., com o intuito de identificar os compostos encontrados na casca desta raiz e confirmar o potencial anti-inflamatório e analgésico desta espécie como relatado na utilização popular.

Tabela 1: Levantamento farmacológico do gênero *Caryocar*. Estudos farmacológicos de espécies do gênero *Caryocar* realizados até o ano de 2018.

Espécie	Atividade	Parte estudada	Preparo	Autor
<i>Caryocar Brasiliense Cambess.</i>	antifúngico	casca do fruto	extrato etanólico	(Breda et al., 2016)
	antifúngico	óleo essencial das sementes	hidrodestilado	(Passos et al., 2002)
	anti-leishmanicida, bactericida e antioxidante	folha	extrato hidroetanólico	(Paula-Junior et al., 2006)
	anti-nemátodos	polpa do fruto	extrato aquoso	(Nogueira et al., 2012)
	antihipolipemiante	polpa do fruto	desidratado	(Teixeira et al., 2013)
	antioxidante	casca do fruto	farinha	(Leão et al., 2017)
	antioxidante	fruto	extrato aquoso	(Machado et al., 2013)
	antioxidante	casca do fruto	extrato aquoso	(Monteiro et al., 2015)
	antioxidante	polpa do fruto	extrato de éter de petróleo	(Plácido et al., 2015)
	antioxidante	polpa do fruto	extrato aquoso	(Castro et al., 2008)
	antioxidante	fruto	extrato etanólico	(Colombo et al., 2015)
	antioxidante	semente e polpa do fruto	extrato etanólico	(Roesler et al., 2008)
	antioxidante e anti-inflamatório	semente	óleo prensado a frio	(Torres et al., 2016)
	antioxidante	óleo da semente	decocção	(Torres et al., 2016)
	anti-tripanocida	casca	extrato bruto etanólico	(Herzog-soares et al., 2002)

	preventivo anticancerigeno	polpa do fruto	óleo extraído com clorofórmio	(Miranda-Vilela et al., 2013)
	quimiopreventivo em lesões preneoplásicas	polpa do fruto	óleo extra-virgem	(Palmeira et al., 2015)
<i>Caryocar coriaceum</i> Wittm.	antibacteriano	óleo da polpa do fruto	extrato hexanico	(Costa et al., 2011)
	anti-inflamatório da pele	óleo da polpa do fruto	decantamento/acetato de etila	(Saraiva et al., 2011)
	anti-inflamatório da pele	óleo da polpa do fruto	produto comercial	(Oliveira et al., 2010)
	anti-inflamatório da pele	óleo fixo da semente	produto comercial	(Oliveira et al., 2010)
	antioxidante	folhas	extrato hidroalcoólico	(Neto et al., 2017)
	antioxidante	folhas	extrato hidroalcoólico	(Figueiredo et al., 2016)
	gastroprotetor	folhas	extrato hidroalcóolico	(Lacerda et al 2017)
	hipolipemiante e antioxidante	óleo da polpa do fruto	decocção com água/retirando o óleo sobrenadante	(Figueiredo et al., 2016)
	problemas gástricos	óleo da polpa do fruto	produto comercial	(Quirino et al., 2009)
<i>Caryocar villosum</i> Pers.	preventivo anti-inflamatório contra artrite	polpa do fruto	extração com acetato de etila	(Oliveira et al., 2015)
	antigenotóxico	polpa do fruto	liofilizado e dissolvido em óleo mineral	(Almeida et al., 2012)
	antioxidante	polpa do fruto	extrato de água/etanol e acetato de etila	(Chisté et al., 2012)

1.6. Referências bibliográficas

- Albuquerque, U.P., Hanazaki, N., 2006. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 678-689.
- Almeida, S.D., Proença, C.E.B., Sano, S.M., Ribeiro, J.F., 1998. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: Embrapa-CPAC,464.
- Almeida, M.R., Darin, J.D.A.C., Hernandes, L.C., Aissa, A.F., Chisté, R.C., Mercadante, A.Z., Antunes, L.M.G., Bianchi, M.L.P., 2012. Antigenotoxic effects of Piquiá (*Caryocar villosum*) in multiple rat organs. *Plant. Foods Hum. Nutr.* 67, 171–177.
- Almeida, S.P., Silva, J.A., 1994. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. Embrapa-Cpac 7–8.
- Araujo, F.D., 1995. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae)—an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. *Economic Botany*, 49(1), 40-48.
- Ascani, J., Takahashi, J.A., Boaventura, M.A.D., 2013. The phytochemistry and biological aspects of Caryocaraceae family. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15, 293-308.
- Bernard, H.R. 1988. Research methods in cultural anthropology. Newbury Park, CA: Sage Publ., 520 pp.
- Balestieri, F.M.P., 2006. Inflamação como mecanismo de resistência natural e agentes infecciosos, 45-49. In:Imunologia.-Barueri, SP: Manole, 2006, pp.3-775.
- Batlouni, M., 2010. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq Bras. Cardiol.* 94, 556-63.
- Bhattaram, V.A., Graefe, U., Kohlert, C., Veit, M., Derendorf, H., 2002. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomedicine*, 9, 1-33.
- Busse, W.W., 1998. Leukotrienes and inflammation. *American journal of respiratory and critical care medicine*, 157, 210-213.
- Bray, M.A., 1986. Leukotrienes in inflammation. *Agents and Actions*, 19, 87-99.
- Brasil, 1995. Agenda 21: Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento. In: Agenda 21: Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento. Senado Federal.

Brasil, 1995. Agenda 21: Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento. In: Agenda 21: Conferência das Nações Unidas sobre meio ambiente e desenvolvimento. Senado Federal.

Breda, C.A., Gasperini, A.M., Garcia, V.L., Monteiro, K.M., Bataglion, G.A., Eberlin, M.N., Duarte, M.C.T., 2016. Phytochemical Analysis and Antifungal Activity of Extracts from Leaves and Fruit Residues of Brazilian Savanna Plants Aiming Its use as safe fungicides. *Nat. Products Bioprospect.* 6, 195–204.

Brieski, I.G.C., Rios Santos, F., de Oliveira, R.M., Espinosa, M.M., Macedo, M., Albuquerque, U.P., Oliveira Martins, D. T., 2012. Ethnopharmacology of medicinal plants of the pantanal region (Mato Grosso, Brazil). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012.

Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141–2153.

Bohm, G.M., 1977. Vascular events in inflammation. *Agents and actions. Supplements*, 3, 31-50.

Campbell, I.B., Macdonald, S.J.F., Procopiou, P.A., 2017. Medicinal chemistry in drug discovery in big pharma: past, present and future. *Drug Discov. Today.* 0.

Carvalho, L.S. de, Pereira, K.F., Araújo, E.G. de, 2015. Características botânicas, efeitos terapêuticos e princípios ativos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*). *Arq. Ciências saúde (UNIPAR)*. 19, 147–157.

Castro, A.J., Grisolia, C.K., de Araújo, B.C., Dias, C.D., Dutra, E.S., Nepomuceno, J.C., 2008. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (*Caryocar brasiliense*) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. *Genet. Mol. Res.* 7, 1375–1383.

Chisté, R.C., Freitas, M., Mercadante, A.Z., Fernandes, E., 2012. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chem.* 135, 1740–1749.

Colombo, N.B.R., Rangel, M.P., Martins, V., Hage, M., Gelain, D.P., Barbeiro, D.F., Grisolia, C.K., Parra, E.R., Capelozzi, V.L., 2015. *Caryocar brasiliense* Camb. protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 48, 852–862.

Conceição, G., Ruggieri, A., Araujo, M.F., Conceição, T.T.M.M., M.A.M.M., C., 2011. Plantas do cerrado: comercialização, uso e indicação terapêutica fornecida pelos raizeiros e vendedores, Teresina, Piauí. *Scientia Plena*. 7, 1–6.

Coutinho, M.A., Muzitano, M.F., Costa, S.S., 2009. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. *Rev. Virt. Quím.* 1, 241-256.

Cordell, G. A., 2000. Biodiversity and drug Discovery – a symbiotic relationship, *Phytochemistry*, 55, 463-480.

Corleto, L. 1993. *Pharmacopoeia in ancient Egypt. Med Secoli*, 5, 1-18.

Crotti, A.E.M., Vessechi, R., Lopes, J.L.C., Lopes, N.P., 2006. Espectrometria de massas com ionização por “Electrospray”: Processos químicos envolvidos na formação de íons de substâncias orgânicas de baixo peso molecular. *Quim. Nova*. 29, 287–292.

Davis, E.W., 1995. Ethnobotany: an old practice, a new discipline, 40-51 in: Schultes, R.E., and Reis, S.V., 1995, *Ethnobotany evolution of a discipline*, 1, 9-407.

Dewick, P.M. *Medicinal natural products: a biosynthetic approach*, 3 ed. England: Wiley, 2009.

Dickison, W. C., 1990. A study of the floral morphology and anatomy of the Caryocaraceae. *Bulletin of the Torrey Botanical Club*, 123-137.

Duarte, D.F., 2005. Uma breve história do ópio e dos opióides. *Rev. Bras. Anestesiol.* 55, 135–146.

Dray, A., 1995. Inflammatory mediators of pain. *Br. J. Anaesth.* 75, 125-131.

Elisabetsky, E., 2003. Etnofarmacologia. *Ciência e Cultura*, 55, 35-36.

Etkin, N.L., 2001. Perspectives in ethnopharmacology: forging a closer link between bioscience and traditional empirical knowledge, *J. Ethnopharmacol.* 76, 177-182.

Figueiredo, P.R.L., Oliveira, I.B., Neto, J.B.S., Ribeiro, L.B., Viana, G.S.B., Rocha, T.M., Leal, L.K.A.M., Kerntopf, M.R., Felipe, C.F.B., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., 2016. *Caryocar coriaceum* Wittm. (Pequi) fixed oil presents hypolipemic and anti-inflammatory effects in vivo and in vitro. *J. Ethnopharmacol.* 191, 87–94.

Ford, R.I., 1978. The nature and status of ethnobotany. *Anthropol. Pap.* 67, 33-49.

Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Molecular aspects of Medicine*, 27, 1-93.

Hamilton, A.C., Shengii, P., Kessy, J., Khan, A., Lagos-Witte, S., Shinwari, Z.K, 2003. The purposes and teaching of Applied Ethnobotany. *People and Plants working paper 11*. WWF, Godalming, UK.

Harshberger, J.W., 1986. The purposes of Ethno-botany, *The University of Chicago press Journals*, 21, 146-154.

Heinrich, M., 2003. Ethnobotany and natural products: the search for new molecules, new treatments of old diseases or a better understanding of Indigenous cultures? *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 29–42.

Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Pardo-de-Santayana, M., 2006. Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *J. Ethnopharmacol.* 107, 157–160.

Heinrich M. 2010. Ethnopharmacology and drug discovery. In *Comprehensive Natural Products II: Chemistry and biology*, ed. R Verpoorte, pp. 351–81. Oxford, UK: Elsevier

Herzog-soares, J.D.A., Alves, R.K., Isac, E., Bezerra, J.C.B., Gomes, M.H., Santos, S.C., Ferri, P.H., 2002. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliense* (pequi) o *Phyllanthus niruri* L. induz calurese dissociada da diurese e da natriurese em ratos acordados. *Rev. Bras. Farmacogn.* 12, 1–2.

Hurrel, J.A., Pochettino, M.L., 2014. Urban ethnobotany:theoretical and methodological contribuitions, in: Albuquerque, U., P., Cunha, L.V.F.C., Lucena, R.F.P., Alves, R.R., N., 2014. Methods and techniques in etnobiology and etnoecology, 1, pp. 1-465.

Kraychete, D.C., Calasans, M.T.D.A., Valente, C.M.L., 2006. Citocinas pró-inflamatórias e dor. *Rev. Bras. Reumatologia*, 46, 199-206

Lanças, F.M., 2009. A cromatografia líquida moderna e a espectrometria de massas: Finalmente “compatíveis”? *Sci. Chromatogr.* 5, 27–46.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M.I., Nourshargh, S., 2007. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev. Immunol.* 7, 678.

Legler, D. F., Bruckner, M., Uetz-von, A., E., Krause, P., 2010. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. In. J. Biochem. Cell Bio. 42, 198-201

Leonti, M., 2011. The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. J. Ethnopharmacol, 134, 542-555.

Lopes, T.C., Gonçalves, J.R.S., Souza, N.S., Moraes, D.F.C., Amaral, F.M.M., Rosa, I.G., 2011. Avaliação Moluscicida e perfil fitoquímico das folhas de *Caryocar brasiliense* Camb. Cad. de Pesq. 18, 30.

Magid, A.A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Harakat, D., Moretti, C., Lavaud, C., 2008. Phenolic glycosides from the stem bark of *Caryocar villosum* and *C. glabrum*. J. Nat. Prod. 71, 914–917.

Magid, A.A., Voutquenne, L., Harakat, D., Pouny, I., Caron, C., Moretti, C., Lavaud, C., 2006. Triterpenoid saponins from the fruits of *Caryocar villosum*. J. Nat. Prod. 69, 919–926.

Marx, F., Andrade, E.H.A., Maia, J.G., 1997. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. Z. für Leb. Und. -Forsch. A., 204, 442–444.

Mathews-Roth, M.M., 1991. Recent progress in the medical applications of carotenoids. Pure Appl. Chem. 63, 147-156.

Mendes, F.R., Carlini, E.A., 2007. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. J. Ethnopharmacol. 109, 493–500.

Messias, M.C.T.B., Menegatto, M.F., Prado, A.C.C., Santos, B.R., Guimarães, M.F.M., 2015. Uso popular de plantas medicinais e perfil socioeconômico dos usuários: um estudo em área urbana em Ouro Preto, MG, Brasil. Rev. Bras. Pl. Med,17, 76-104.

Miranda-Vilela, A.L., Peixoto, R.C.A., Longo, J.P.F., E Cintra, D.D.O.S., Portilho, F.A., Miranda, K.L.C., Sartoratto, P.P.C., Bão, S.N., De Azevedo, R.B., Lacava, Z.G.M., 2013. Dextran-functionalized magnetic fluid mediating magnetohyperthermia combined with preventive antioxidant pequi-oil supplementation: Potential use against cancer. J. Biomed. Nanotechnol. 9, 1261–1271.

Monteiro, S.S., Silva, R.R. da, Martins, S.C. da S., Barin, J.S., Rosa, C.S. da, 2015. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). *Int. Food Res. J.* 22, 1985–1992.

Monteles, R., and B Pinheiro, C.U., 2007. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Rev. Biol. Ciênc. Terra*, 7.

Neto, L.J.L., Ramos, A.G.B., Kerntopf, M.R., Coutinho, H.D.M., Quintans-Junior, L.J., Almeida, J.R.G.S., Ribeiro-Filho, J., Menezes, I.R.A., 2017. Modulation of antibiotic activity by the hydroalcoholic extract from leaves of *Caryocar coriaceum* Wittm. *Nat. Prod. Res.* 6419, 1–4.

Nogueira, F.A., Fonseca, L.D., Da Silva, R.B., De Paiva Ferreira, A. V., Nery, P.S., Geraseev, L.C., Duarte, E.R., 2012. In vitro and in vivo efficacy of aqueous extract of *Caryocar brasiliense* Camb. to control gastrointestinal nematodes in sheep. *Parasitol. Res.* 111, 325–330.

Oliveira, M.L.M., Nunes-Pinheiro, D.C.S., Tome, A.R., Mota, E., F., Lima-Verde, I.A., Pinheiro, F.G.M., Campello, C.C., de Morais, S.M., 2010. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. *J. Ethnopharmacol.* 129, 214–219.

Oliveira, M.L.M., Nunes-Pinheiro, D.C.S., Tomé, A.R., Mota, É.F., Lima-Verde, I. A., de Melo Pinheiro, F. G., Morais, S. M., 2010. In vivo topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. *J. of ethnopharmacol.* 129, 214-219.

Oliveira, F.F.B., Araújo, J.C.B., Pereira, A.F., Brito, G.A.C., Gondim, D.V., Albuquerque Ribeiro, R., Vale, M.L., 2015. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of *Caryocar coriaceum* Wittm fruit pulp fixed ethyl acetate extract on zymosan-induced arthritis in rats. *J. Ethnopharmacol.* 174, 452-463.

Palmeira, S.M., Silva, P.R.P., Ferrão, J.S.P., Ladd, A.A.B.L., Dagli, M.L.Z., Grisolia, C.K., Hernandez-Blazquez, F.J., 2015. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 1.

Pasquale, A., 1984. Pharmacognosy: The oldest modern science. *J. Ethnopharmacol.* 11, 1–16.

Passos, X.S., Santos, S., C., Ferri, P.H., Fernandes, O., F., Paula, T.F., Garcia, A.C., Silva, M.R., 2002. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 35, 623–627.

Paula-Junior, W., Rocha, F.H., Danatti, L., Fadel-picheth, C.M.T., Weffort-Santos, A.M., 2006. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess. leaves hydroethanolic extract. Brazilian J. Pharmacogn. 16, 625–630.

Prance, G.T., 1991. What is ethnobotany today. J. Ethnopharmacol. 32, 209–216.

Prance, G.T., Silva, M.F., 1973. Caryocaraceae. Fla. Neotrop. 1-75.

Posey, D. 1987. Etnobiologia: Introdução e prática, in: Suma Etnológica brasileira, Etnobiologia, 1987. Berta G. Ribeiro 2^a edição.

Quirino, G.S., Leite, G.O., Rebelo, L.M., Tomé, A.R., Costa, J.G.M., Cardoso, A.H., Campos, A.R., 2009. Healing potential of Pequi (*Caryocar coriaceum* Wittm.) fruit pulp oil. Phytochem. Lett. 2, 179–183.

Ramos, M.I.L., Umaki, M.C.S., Hiane, P.A., Ramos Filho, M.M., 2001. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb). B. C.E.P.P.A. 19, 1.

Ramos, B.H., Silva, K.L.F., Coimbra, R.R., Chagas, D.B., Ferreira, W.D.M., 2015. Anatomy and micromorphometry of *Caryocar brasiliense* leaves. Rodriguésia, 66, 87–94.

Rankin, J.A., 2004. Biological mediators of acute inflammation. AACN Advanced Critical Care, 15, 3-17.

Rezende, G.A.A., Terrones, M.G.H., Rezende, D.M.L.C., 2011. Estudo do potencial alelopático do extrato metanólico de raiz e caule de *Caryocar brasiliense* Camb. (Pequi). BioScience J. 27.

Ricciotti, E. and FitzGerald, G.A., 2011. Prostaglandins and inflammation. Arterioscler. Thromb. Vasc. Boil. 31, 986-1000.

Roesler, R., Catharino, R.R., Malta, L.G., Eberlin, M.N., Pastore, G., 2008. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. Food Chem. 110, 711–717.

Rodrigues, V.E.G., Carvalho, D.D., 2001. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande–Minas Gerais. Ciênc. Agrotec. 25, 102-123.

Saraiva, R.A., Araruna, M.K.A., Oliveira, R.C., Menezes, K.D.P., Leite, G.O., Kerntopf, M.R., Costa, J.G.M., Rocha, J.B.T., Tomé, A.R., Campos, A.R., Menezes, I.R.A., 2011. Topical anti-inflammatory effect of *Caryocar coriaceum* Wittm. (Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. *J. Ethnopharmacol.* 136, 504–510.

Silva, I.A., Batalha, M.A., 2010. Woody plant species co-occurrence in Brazilian savannas under different fire frequencies. *Acta Oecologica*. 36, 85-91.

Simões, C. M. O., 2016. Farmacognosia: da planta ao medicamento. UFRGS; Florianópolis: UFSC.

Sipos, P., Györy, H., Hagymási, K., Ondrejka, P., Blázovics, A., 2004. Special Wound Healing Methods Used in Ancient Egypt and the Mythological Background. *World, J. Surg.* 28, 211–216.

Souza-Ferreira, A.L., Batista, C.A.S., Pasa, M. C., 2015. Uso de plantas medicinais na comunidade quilombola Mata Cavalo em Nossa Senhora do–MT, Brasil. *Biodiversidade*, 14, 1

Schultes, R.E., 1994. The importance of ethnobotany in environmental conservation, *Am. J. Econ. Sociol.* 53, 202-206.

Teixeira, T.N., Esteves, E.A., Oliveira, L.G., Oliveira, L.P., Santana, R.C., Andrade, N., Dessimoni, V., 2013. *Caryocar brasiliense* pulp increases serum HDL and reduces hepatic lipid accumulation in rats fed a high fat diet. *J. Med. Plants. Res.* 7, 963–969.

Torres, L.R.O., Shinagawa, F.B., Santana, F.C., Araújo, E.S., Oropeza, M.V.C., Macedo, L.F.L., Almeida-Muradian, L.B., Lima, H.C., Mancini-Filho, J., 2016. Physicochemical and antioxidant properties of the pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil obtained by handmade and cold-pressed processes. *Int. Food Res. J.* 23, 1541–1551.

Wright, A., 1999. Recent concepts in the neurophysiology of pain. *Man. Ther.* 4, 196-202.

Yuan, H., Ma, Q., Cui, H., Liu, G., Zhao, X., Li, W., Piao, G., 2017. How can synergism of traditional medicines benefit from network pharmacology?. *Molecules*, 22, 1135.

2. Objetivos

Realizar um levantamento etnobotânico, avaliar a ação anti-inflamatória e anti-hiperalgésica do extrato aquoso da casca da raiz de *Caryocar brasiliense* (pequi) e identificar seus constituintes químicos.

2.1. Objetivos Específicos

- Levantar dados etnobotânicos sobre *C. brasiliense*;
- Preparar extrato aquoso da casca das raízes do pequi;
- Identificar os compostos químicos presentes na raiz por meio do CLAE-DAD-EM/EM
- Quantificar o teor fenóis e taninos totais;
- Testar a estabilidade dos compostos presentes no extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense*;
- Determinar o potencial antioxidante da casca da raiz de *C. brasiliense*.
- Avaliar o potencial de toxicidade de *C. brasiliense*.
- Avaliar o edema de pata induzido por carragenina após o tratamento com extrato aquoso liofilizado das raízes do pequi.
- Avaliar o influxo leucocitário após o tratamento com extrato aquoso liofilizado das raízes do pequi.
- Avaliar o efeito anti-hiperalgésico após o tratamento com extrato aquoso liofilizado das raízes do pequi.

Capítulo II

Etnofarmacologia da utilização da casca da raiz do pequi (*Caryocar brasiliense Cambess.*- *Caryocaraceae*) como anti-inflamatória e anti-hiperalgésica

Ellen Pereira da Silva Maciel^a, Katyuce de Souza Farias^a, Jéssica de Araújo Isaias Muller^d, Iluska Senna Bonfá Moslaves^d, Edson Lucas dos Santos^c, Mônica Crsitina Toffoli Kadri^d, Ieda Maria Bortolotto^b, Carlos Alexandre Carollo^a.

^aLaboratório de produtos naturais e espectrometria de massas (LAPNEM), Programa de pós-graduação em Biologia Vegetal, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), 79070-900, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

^bLaboratório de etnobotânica, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

^cGrupo de pesquisa em Biotecnologia e Bioprospecção aplicada ao metabolismo (GEBBAM), Universidade Federal da Grande Dourados, Rodovia Dourados-Itahum, Km 12, Dourados MS 79804-970, Brasil.

^dLaboratório de Farmacologia e Inflamação, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), 79070-900, Campo Grande, MS, Brasil.

Abstract

Relevância etnofarmacológica: O pequizeiro é uma árvore muito utilizada popularmente no Brasil, para fins alimentícios e medicinais. A casca da raiz do pequizeiro é utilizada popularmente como anti-inflamatório, porém este uso ainda não havia sido investigado.

Objetivos do estudo: Investigar o uso popular da casca raiz do pequi, identificar possíveis princípios ativos e avaliar a toxicidade e efeitos anti-inflamatório e anti-hiperalgésico *in vivo*.

Material e método: O extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* foi preparado simulando o uso popular (extração aquosa a frio, com tempo de extração de 1 a 9 dias) verificando a estabilidade dos compostos nos diferentes tempos de extração. A identificação do perfil químico foi realizada por CLAE-DAD-EM/EM e quantificação de taninos e compostos fenólicos totais foi verificado através do método de Folin-

Ciocalteu, o potencial antioxidante foi verificado por meio do método DPPH. Foi testado toxicidade em *C. elegans*. O potencial farmacológico do extrato foi determinado por meio da avaliação anti-inflamatória no teste de edema de pata e influxo leucocitários induzido por carregenina e da avaliação anti-hiperalgésica no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético.

Resultado: Foi verificado que o extrato não apresentou diferenças significativas nos diferentes tempos de extração, apresentando 6,1% de compostos fenólicos totais e 5,0% de taninos totais, atividade antioxidante com IC_{50} de $16,15 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$, equivalente ao apresentado pelo ácido gálico. O perfil químico apresentou derivados de galotaninos, elagitaninos, taninos hidrolisáveis e saponinas triterpênicas. O EACb não demonstrou toxicidade em modelo *C. elegans*, ainda, demonstrou efeitos nas atividade anti-inflamatória e anti-hiperalgésica em dose equivalente à utilizada popularmente.

Conclusão: O uso popular das cascas da raiz do pequi em tratamentos de dor e inflamações pode ser atribuído ao perfil químico apresentado e as atividades antioxidantes, anti-inflamatória e anti-hiperalgésica. Assim, o presente estudo sugere uma confirmação da utilização popular desta espécie.

Palavras chaves: Pequi, uso popular, dor, inflamação, compostos fenólicos.

1. Introdução

A utilização de plantas em tratamentos medicinais é uma prática muito antiga, com registros em todos os continentes habitados (Gurib-Fankin, 2006), recentemente também se reconhecem os conhecimentos populares ocorrentes em ambientes urbanizados (Hurrel e Pochettino, 2014; Bitu et al., 2015). De uma maneira geral, estudos do conhecimento popular em conjunto com avanços tecnológicos aceleram a descoberta de novos compostos bioativos (Butler, 2004; Ptwardhan, 2005).

O Brasil abriga 20% da biodiversidade vegetal do planeta, (Giuliani et al., 2005). Na região central, mais precisamente nas áreas de cerrados, ocorre o pequizeiro, *Caryocar brasiliense* (Silva e Batalha, 2010). Esta árvore produz frutos carnosos utilizados em pratos típicos, assim como o óleo empregado na alimentação e uso tópico como cicatrizante (Araújo, 1995; Rodrigues e Carvalho, 2001; Messias et al, 2015), suas folhas são utilizadas em infusos para tratar problemas relacionados ao ciclo menstrual (Almeida et al, 1994).

Alguns estudos farmacológicos realizados dão suporte à utilização popular desta espécie, como potencial anti-inflamatório e antioxidante do óleo das sementes (Torres et al., 2016), como anti-leishmanicida, bactericida e antioxidante das folhas (Paula-Junior et al., 2006) e óleo extraído da polpa como preventivo em lesões pré-neoplásicas (Palmeira et al., 2015).

A casca da raiz do pequi também é utilizada na medicina popular (Ribeiro et al., 2017), entretanto não foram encontrados estudos sobre sua ação farmacológica ou perfil químico. Assim, este trabalho teve como objetivo obter informações do uso tradicional de *C. brasiliense* através de entrevistas etnofarmacológicas, determinar o perfil químico e testar a estabilidade dos compostos de extratos similares a utilização popular (aquoso das cascas da raiz) e avaliar as atividades anti-inflamatória e anti-hiperalgésica desse extrato, assim como uma possível toxicidade em *C. elegans*.

2. Materiais e métodos

2.1. Levantamento dos dados etnofarmacológicos

As entrevistas foram realizadas com moradores residentes no bairro Jardim Noroeste de Campo Grande - MS, com idade maior ou igual a 18 anos, de ambos os sexos que utilizavam ou conheciam o uso das cascas da raiz de *Caryocar brasiliense* em tratamentos de dor e inflamações.

Como se tratava de um uso ainda não investigado na perspectiva da etnofarmacologia, optou-se pela busca de informações por meio de entrevistas semi-estruturadas (Anexo 8.2) para obtenção de dados sociodemográficos, etnobotânicos e etnofarmacológicos, utilizando a técnica bola de neve (Bernard, 1988).

2.2. Aspecto ético

O estudo etnobotânico foi aprovado em 12 de julho de 2017 pelo Comitê de Ética para pesquisas com seres humanos (Certificado de Apresentação para Apreciação Ética – CAAE – sob o protocolo 64519917.4.0000.0021, Parecer: 2.169.092). As entrevistas ocorreram após a leitura e assinatura do termo de consentimento livre esclarecido, apresentado no início das abordagens aos informantes (Anexo 8.1).

2.3. Coleta do material vegetal

As amostras vegetais utilizadas foram coletadas na Reserva Particular de Patrimônio Natural da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (RPPN-UFMS) (20°27' S e 54°37' W, 530), mediante a autorização ambiental do Sistema de autorização e informação em biodiversidade (SISBIO) - de número 55367-2 (Anexo 8.3). O material vegetal foi identificado, e uma exsicata foi depositada no herbário da UFMS com o registro 64278 CG-MS.

2.4. Preparo do extrato vegetal e teste de estabilidade dos compostos

O preparo do extrato foi baseado nos relatos dos entrevistados. As raízes foram higienizadas com água, a casca da raiz foi retirada e seca em estufa a 40° C (3,5 Kg teve rendimento de 19,16% de matéria seca), e triturados em moinho de facas.

A fim de testar a estabilidade dos compostos em soluções aquosas foram utilizados 4 mg de planta e 2 mL de água deionizada, sendo mantidos a 5º C, repetindo isto em nove recipientes. Porém cada uma dessas amostras apresentavam um tempo de extração diferente, de 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 h, sendo analisadas em duplicatas.

Todas as amostras provenientes dos diferentes tempos de extração foram analisadas em um cromatógrafo UFC Shimadzu LC-20AD acoplado a detectores arranjo de diodos (DAD) e espectrômetro de massas microTOFIII (Bruker Daltonics) com fonte de ionização por eletrospray e analisadores de massas quadrupolo-Time-of-flight (IES-QTOF). As análises foram monitoradas entre 240-800nm e obtidas nos modos de ionização positiva e negativa (m/z 120-1300). Para a análise foi utilizada uma coluna C-18 (Kinetex, 2.6 μ m, 150 x mm, Phenomenex) e pré-coluna de mesma fase estacionária. Como fase móvel foi utilizada água (fase A) e acetonitrila (fase B) contendo 0,1% de ácido fórmico. O seguinte gradiente de eluição foi aplicado: 1-8min a 3% B-; 8-30min de 3 a 25% B; 30-60min de 25 a 80% de B-; e 8min para o recondicionamento da coluna. Foi utilizado fluxo de 0,3mL/min

Os dados brutos obtidos foram alinhados no software Metalign (Lommen, 2009). Os dados obtidos do alinhamento foram 264 sinais de massas que posteriormente foram reagrupados no software Msclust, programa que agrupa os íons de um mesmo composto (Tikunov et al., 2012), resultando no total de 63 metabólitos reconstruídos, que posteriormente foram analisados na plataforma MetaboAnalyst 4.0 (Chong et al., 2018).

Após o teste de estabilidade, foi realizada uma extração em maior escala para posterior utilização nos ensaios biológicos, sendo aplicado o tempo de extração otimizado. Foi utilizado 10 g de planta em 500 mL de água Milli-Q mantidos por 72 horas a 5º C. Posteriormente, o extrato aquoso foi liofilizado, apresentando um rendimento de 14%, e foi denominado extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb).

2.5. Perfil químico do EACb

A identificação dos compostos foi realizada pelo método descrito no item 2.4, utilizando dados de fragmentação, comparação com a literatura e padrões autênticos do ácido gálico e ácido elágico.

2.6. Quantificação de compostos fenólicos e taninos totais do extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* (EACb)

O método utilizado para quantificar compostos fenólicos e taninos é descrita por Herald e colaboradores, (2012). Inicialmente o EACb foi diluído em 5mL de água na concentração de 10 mg/mL e então retirado 3 mL para a quantificação de taninos totais. 3 mL de extrato foi centrifugado por 60 minutos com pó-de-pele, o sobrenadante foi retirado e por diferença do que precipitou foi obtido a quantificação de taninos totais.

Em uma placa de 96 poços foi realizado a diluição seriada em triplicatas e um grupo controle, da alíquota tratada com pó-de-pele, o extrato inicial na concentração 23, 46, 93, 187 e 375 μ g/ μ L e o ácido gálico a 1 mg/mL utilizado para a obtenção da curva padrão nas concentrações de 23, 46, 93, 187 e 375 μ g/ μ L. O reagente Folin-Ciocalteu diluído em água 1:1 v:v foi pipetado em cada poço agindo por seis minutos, em seguida foi pipetado Na_2CO_3 (óxido nítrico), após uma hora e meia foi realizada a leitura das absorbâncias no comprimento de onda 765 nm em espectrofotômetro SpectraMax Plus 384. Taninos e fenóis foram calculados em mg/g equivalentes a ácido gálico usando a equação da linha obtida da curva padrão $y = 0.2588x + 0.0027$, $R = 0,999$.

2.7. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH)

A capacidade de EACb sequestrar o radical livre DPPH foi avaliado conforme descrito por Fukomoto e colaboradores (2000). 0,002g/mL do extrato foi diluído em 200 μ L de água e 800 μ L de metanol (2:8, v/v) nas concentrações (222,22; 111,11; 55,56; 27,78; 13,89; 6,94; 3,47; 1,74; 0,87 e 0,43 μ g/mL) adicionado 1 mL de solução de DPPH a 0,4 mM em metanol.

A mistura foi deixada no escuro por seis horas e a absorbância mensurada a 516 nm. O flavonoide quercetina foi utilizado como padrão de referência nas concentrações (55,56; 27,78; 13,89; 6,94; 3,47; 1,74; 0,87; 0,43; 0,22; 0,11; 0,05 e 0,03 μ g/mL). A capacidade de sequestrar os radicais DPPH foi depois calculada em relação ao controle (que contém todos os reagentes sem a amostra de teste). A capacidade de eliminação de DPPH foi calculado de acordo com a seguinte equação:

(%)= $[(\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}) / \text{Abs}_{\text{control}}] \times 100$.

2.8. Ensaios biológicos

2.9. Avaliação de toxicidade aguda *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*

A estirpe N2 (tipo selvagem) do nematoide *Caenorhabditis elegans* obtidas do *Caenorhabditis* Genetics Center (CGC), foi incubada a 20 °C em placas de Petri contendo Nematoide Growth Medium (NGM), e alimentados com a cepa OP50-1 de *Escherichia coli*. A cultura do nematoide foi sincronizada através do tratamento de hermafroditas grávidas com hipoclorito de sódio (2%) e hidróxido de sódio (5 M).

O ensaio de toxicidade para o EACb foi realizado em *C. elegans* (Lewis e Fleming, 1995) em placas de 96 poços. Cada poço continha 20 nematoides no estágio L4, que foram incubados por 24 e 48 horas a 20 °C com o EACb em diferentes concentrações (7,5 –1000 µg/mL) em meio M9. Para avaliar a viabilidade os nematoides foram tocados com um fio de platina. Para a manipulação e a avaliação dos nematoides, foi utilizado um estereomicroscópio modelo Motic SMZ-168 (British Columbia, Canadá). Os dados foram calculados a partir de três experimentos independentes em triplicatas.

2.10. Avaliação biológica *in vivo* em animais

Foram utilizados camundongos (linhagem Swiss), adultos, machos, pesando entre 18-30g, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Os mesmos foram mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Farmacologia e Inflamação /UFMS à temperatura de 22°C, com ciclo claro/escuro de 12 horas, recebendo ração padrão (NUVITAL CR®) e água à vontade. Após a utilização, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética em Pesquisas com Animais – CEUA/ UFMS (Protocolo nº 842/2017, Anexo 4).

Delineamento experimental: em todos os ensaios os animais receberam o pré-tratamento por via oral (v.o.; gavage), 60 minutos antes da administração do estímulo

por via intraplantar (i.pl.) ou intraperitoneal (i.p.), conforme descrito nos itens 2.11 e 2.12. A dose de escolha foi baseada na utilizada popularmente equivalente a um punhado para uma preparação fitoterápica de um litro de água, utilizada por uma semana, representado aproximadamente dose diária de 16 mg/Kg, a partir desta dose inicial testamos uma dose inferior de 1mg/Kg e uma dose superior de 40 mg/Kg.

2.11. Avaliação anti-inflamatória

2.11.1. Avaliação do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre de edema de pata induzido por Carragenina

O ensaio foi realizado de acordo com o método adaptado descrito por Winter e colaboradores (1962). Neste ensaio a pata direita posterior de cada animal foi utilizada como controle. Após o pré-tratamento, os animais receberam uma injeção via intraplantar (i.pl.) de carragenina (Cg) 1% (40 μ L/pata) na pata esquerda posterior, sendo a outra pata utilizada como controle (solução salina 0,9%, 40 μ L/pata). Feito isso, o volume das patas foi avaliado após os intervalos de 30, 60, 120, 240 minutos da injeção do estímulo, por meio de um pleismômetro digital (Insight®). O edema foi determinado pela diferença entre os volumes da pata controle e da pata tratada. O resultado foi expresso em mL.

2.11.2. Avaliação do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre influxo leucocitário induzido por Carragenina

A determinação do infiltrado leucocitário para a cavidade peritoneal foi conduzida de acordo com o método descrito por Souza; Ferreira (1985). Após o pré-tratamento, os animais receberam 0,5 mL de Cg 1% intraperitoneal (i.p.). Quatro horas após a injeção da Cg, os animais foram submetidos à eutanásia em câmara de CO₂ e em seguida foi avaliado o influxo leucocitário para a cavidade peritoneal. A cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de solução salina tamponada (PBS) heparinizada a 0,1% contendo albumina sérica bovina (3%) a 1%. Após, foram realizadas a coleta do exsudato peritoneal e as contagens total e diferencial das células. Para a contagem total dos leucócitos, foram retirados 10 μ L do exsudato e acrescidos de 190 μ L do Líquido de Turk, e realizada a contagem em câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial, o exsudato foi centrifugado a 1000 rpm/10

min. O sobrenadante foi armazenado, o sedimento ressuspensionado em 200 μ L de albumina bovina a 3% e distribuído em lâminas que foram coradas com o corante HEMA3® para posterior contagem diferencial das células. As células foram classificadas como mononucleares ou polimorfonucleares de acordo com critérios morfológicos. Os resultados foram expressos em número de células por mm^3 .

2.12. Avaliação anti-hiperalgésica

2.12.1. Avaliação do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre contorção abdominal induzida pelo ácido acético

O ensaio foi conduzido de acordo com o método descrito por Koster et al., (1959). Após o pré-tratamento, a solução de ácido acético a 0,6% (v/v), diluído em água destilada foi administrada por via i.p. em um volume de 10 mL/Kg de peso. O número de contorções abdominais apresentado pelos animais foi registrado durante 30 minutos (min) após a injeção do estímulo. Os resultados foram expressos em números de contorções.

2.13. Análise estatística

Para a identificação de compostos os dados foram submetidos a uma análise de agrupamento com auxílio do software Metalign, com obtenção de 263 sinais de massas que posteriormente foram reagrupados no software Msclust, com total de 63 metabolitos reconstruídos, sendo analisados na plataforma MetaboAnalyst 4.0.

Para os ensaios biológicos o programa utilizado foi o Graph Pad Prism® (versão5.0). Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (EPM). A comparação entre grupos, para determinação dos níveis de significância foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias (ensaio de edema de pata) seguida pelo teste de Tukey. Diferenças com $P < 0,05$ foram consideradas significativas.

3. Resultados

3.1. Levantamento dos dados etnofarmacológicos

Dentre os dados sociodemográficos levantados encontram-se a idade dos dois entrevistados (cinquenta e oitenta anos de idade) e a residência deles no local há mais de cinco anos. Um tinha nível de escolaridade fundamental completo e o outro superior completo. Ambos preferencialmente adotavam tratamentos alternativos com plantas e alegaram ter aprendido sobre plantas medicinais com familiares e vizinhos.

Outro dado apontado foi a forma de utilização e preparo das raízes de *C. brasiliense*, os dois entrevistados alegaram coletar a raiz em qualquer época do ano em árvores de fácil acesso, esse material era higienizado com água e seco. Para preparar o macerado utilizam como forma de medida uma mão cheia (20 mg) contendo casca da raiz misturado a 1 litro de água e armazenado em local refrigerado por até uma semana, mantendo o tratamento até os sintomas desaparecerem, chegando até três meses de uso.

Os sintomas tratados pelo extrato aquoso de *C. brasiliense* incluíam dor crônica e aguda nos ossos e coluna após a realização de movimentos que exigem muita força ou dor originado por desgaste natural, sintomas que eram tratadas com medicamentos anti-inflamatório e analgésico e sem melhora ou com ocorrência de efeitos colaterais procuraram a utilização da casca da raiz do pequi.

3.2. Teste de estabilidade durante diferentes tempos de extração

Os extratos aquosos foram mantidos em maceração e analisados por CLAE-DAD-EM a cada 24h até 9 dias. Os compostos não apresentarem diferenças qualitativas significativas durante os diferentes tempos de extração, com exceção do grupo 9 (216 h) como pode ser observado no dendograma (Figura 1). Porém este tempo 9 (216 h) está além do máximo (7 dias) período de uso do macerado a frio da casca da raiz do pequi segundo os relatos populares.

O heatmap (Figura 2) apresenta menor intensidade de vários compostos após nove dias (216 h), esta ausência pode ser resultado da degradação dos metabólitos devido ao elevado tempo de extração, ligações O-glicosídicas características dos derivados de ácido gálico e derivados do ácido elágico presentes no EACb, podem

ser quebradas em um processo de hidrólise, gerando monômeros do ácido gálico ou ácido elágico, os quais devido a limitada solubilidade em água podem precipitar.

Sendo assim, o tempo de 72 h de extração foi escolhido, de maneira aleatória, para o preparo do extrato utilizado nos ensaios biológicos e de caracterização química.

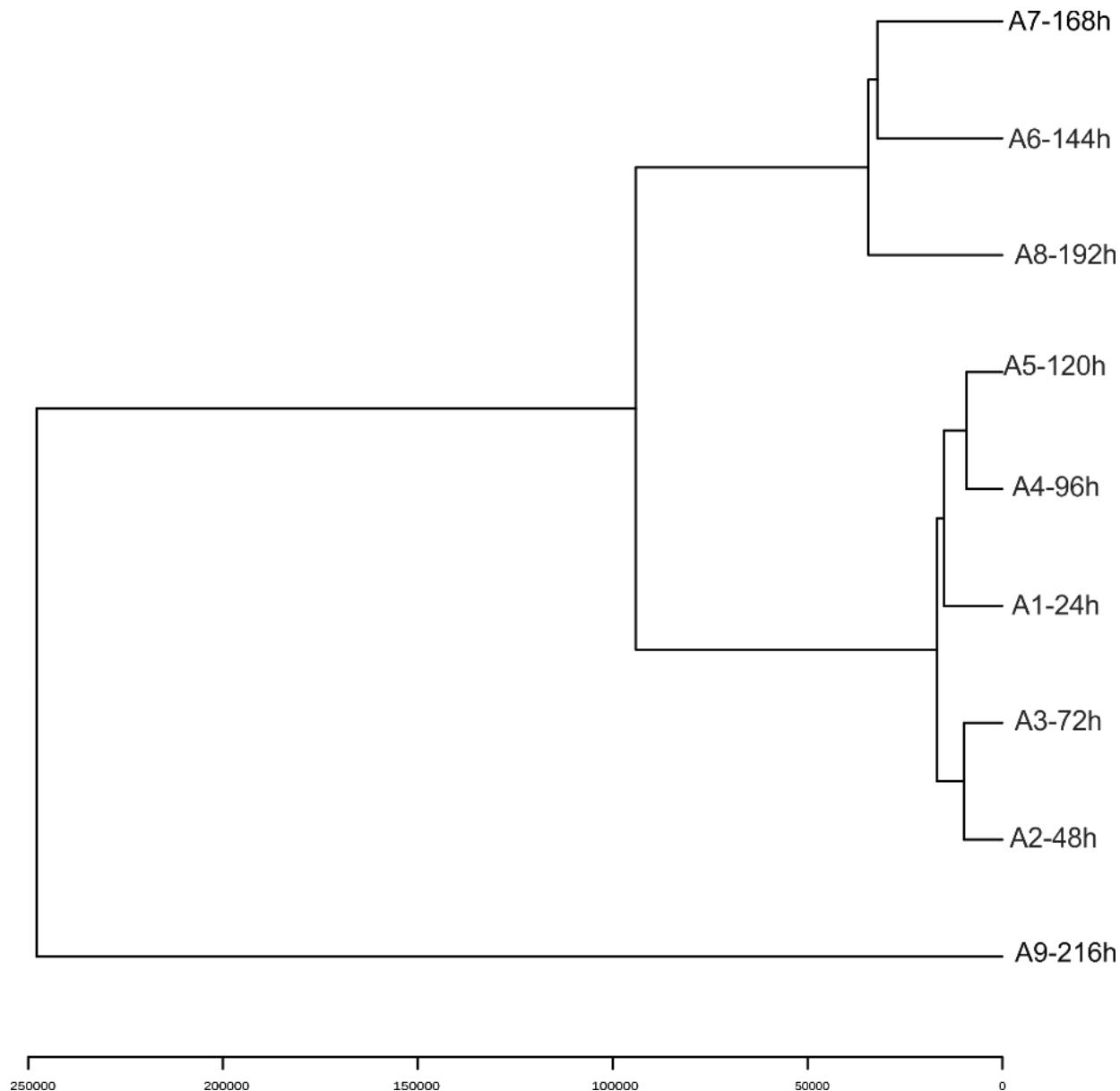


Figura 1: Dendrograma referente ao teste de estabilidade dos compostos em diferentes tempos de extração. As amostras (A) com respectivos tempos de extração (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h e 216 h), foram agrupadas de acordo com a similaridade dos compostos.

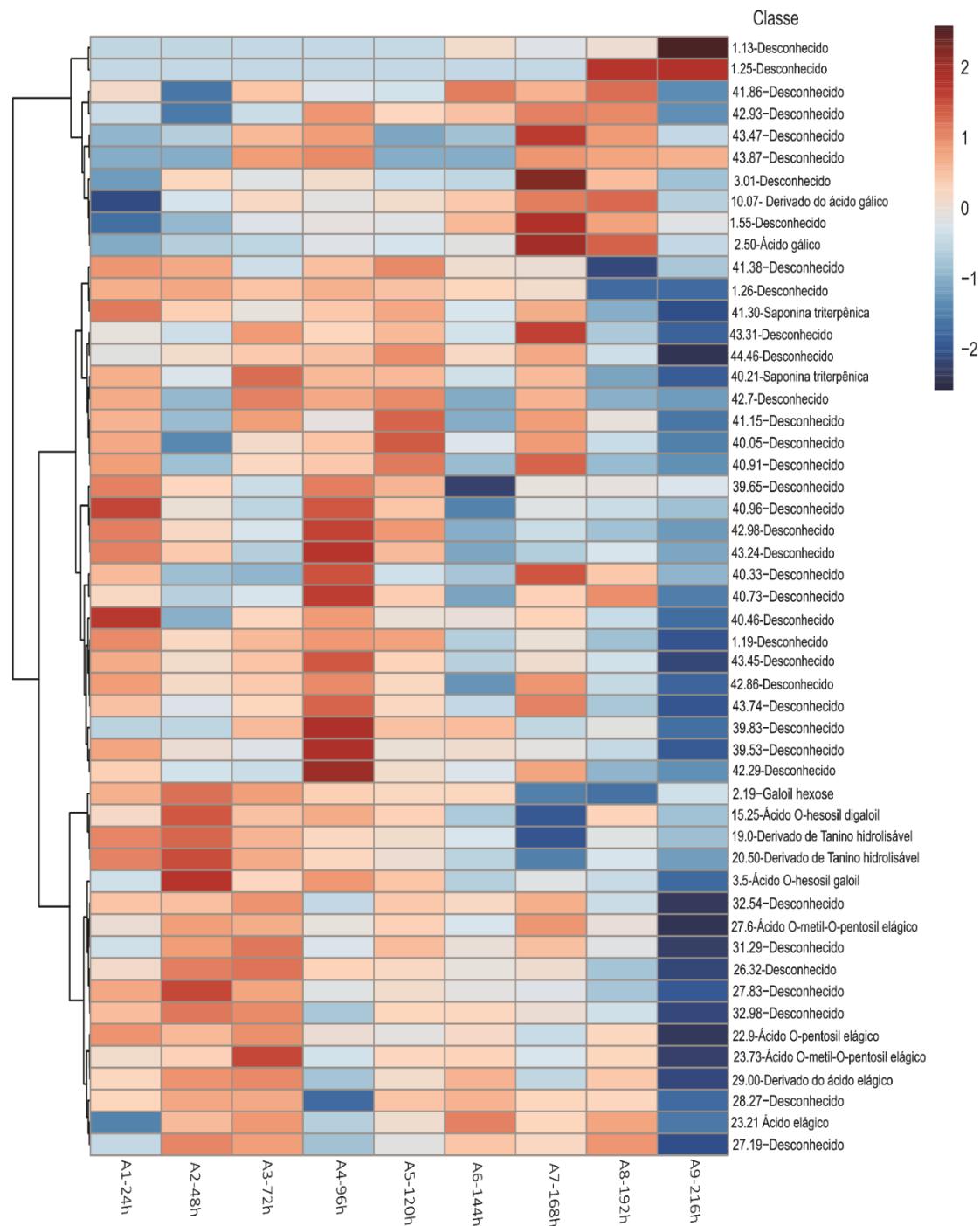


Figura 2: Heatmap referente ao teste de estabilidade dos compostos do extrato aquoso da raiz de *C. brasiliense* (EACb). Apresentando a intensidade dos compostos (cores frias: menor intensidade; cores quentes: maior intensidade) nas amostras (A) com seus respectivos tempos de extração (24 h, 48 h, 72 h, 96 h, 120 h, 144 h, 168 h, 192 h e 216 h). A amostra nove 9 (216 h) apresentou menor intensidade de compostos.

3.3. Caracterização química

3.4. Analise do perfil químico

A análise dos dados obtidos por CLAE-DAD-EM/EM, foi possível observar 35 picos no cromatograma (Figura 3), levando identificação das seguintes classes taninos hidrolisáveis, derivados de ácido gálico, de ácido elágico e triterpênicos (Tabela 2). As identificações foram baseadas na absorção no UV e padrões de fragmentação encontrados na literatura, o nível de identificação de forma numérica dos compostos foi baseado na classificação de Salek e colaboradores (2013), sendo que 1 é atribuído a compostos identificados por comparação com padrões, 2 para compostos putativamente identificados, 3 para características da classe e 4 para compostos não identificados.

Os taninos são conhecidos por formar complexos com celulose, pectinas, alcaloides e principalmente proteínas, e estarem relacionados com sabor adstringente em diversos frutos (Swain and Bate-smith, 1962). Esta classe é constituída por dois grupos: os taninos condensados que são oligômeros de catequina ligados por ligações C-C e os taninos hidrolisáveis que são oligômeros de ácido gálico (galotaninos) e/ou ácido elágico ou ácido hexahidroxidifênico (elagitaninos).

O espectro de UV apresentado para ácido gálico apresenta uma absorção centrada em 275 nm e o ácido elágico apresenta uma primeira banda com 250 nm e segunda banda 375 nm.

Os galotaninos são conhecidos por apresentar íons fragmentos com perdas consecutivas de grupos de galool [M-H-152]⁻ ou seguidos de uma perda consecutiva de uma molécula de água [M-H-170]⁻. Os elagitaninos apresentam íons fragmentos produzidos a partir de perdas de unidades galool [M-H-152]⁻ e HHDP (Hexahidroxidifenil) ou ácido elágico [M-H-301]⁻, sendo este último utilizado para diferenciar as classes de galotaninos e elagitaninos (Mena et al., 2012).

Os picos 4 a 6, descritos na tabela 2, apresentaram fragmentos m/z [M-H-170]⁻ e UV em torno de 270 nm, característicos dos derivados de ácido gálico, Sendo que o pico 5 foi confirmado com padrões autênticos. O pico 7 (*m/z* 637,0709 [M-H]⁻, C₂₆H₂₁O₁₉⁻) não apresentou este fragmento, sendo somente classificado através do UV em 273 nm. O pico 8 (*m/z* 483,0778 [M-H]⁻, C₂₀H₁₉O₁₄⁻) apresentou os fragmentos [M-H-170]⁻ e [M-H-313]⁻ que indicam a perda de duas porções de galool, indicando

provavelmente que possa ser um ácido O-hexosil digaloil (Mammela et al., 2000; Mena et al., 2012; Santos et al., 2013).

Os picos 9 (m/z 625,0632 [$M-H$] $^{-2}$, $C_{53}H_{39}O_{36}^{-}$) e 10 (m/z 801,0829 [$M-H$] $^{-}$, $C_{34}H_{25}O_{23}^{-}$) foram identificados como derivados de tanino hidrolisável, por apresentar a massa acima de 500, porém não foi possível encontrar na literatura dados sobre a fragmentação de compostos compatíveis com a composição molecular do pico 9, entretanto, o pico 10 segundo a literatura é compatível com o ácido malotínico (Giacomini et al., 2014), sendo necessária a comparação com o padrão deste composto para sua confirmação definitiva.

Os picos 11 (m/z 433,0445 [$M-H$] $^{-}$, $C_{19}H_{13}O_{12}^{-}$); 12 (m/z 301,0001 [$M-H$] $^{-}$, $C_{14}H_{5}O_{8}^{-}$); 14 (m/z 447,0584 [$M-H$] $^{-}$, $(C_{20}H_{15}O_{12}^{-})$, 15 m/z 461,0732 [$M-H$] $^{-}$, $(C_{21}H_{17}O_{12}^{-})$ e 17 (m/z 599,0687 [$M-H$] $^{-}$, $C_{34}H_{15}O_{11}^{-}$) apresentaram UV com duas bandas em 259 e 360 nm, compatíveis com derivados do ácido elágico que foram comparados com padrões autênticos, já o pico 16 (m/z 649,1455 [$M-H$] $^{-}$, $C_{22}H_{33}O_{22}^{-}$) não apresentou UV devido à baixa concentração, nomeado como desconhecido, porém apresentou um íon fragmento de m/z 169 [$M-H$] $^{-}$ ($C_7H_5O_5^{-}$), indicando a presença de um grupo galool. A fragmentação demonstra a perda do grupo HHDP para o pico 11, identificado possivelmente como ácido elágico ligado a uma pentose (Tavares et al., 2016), o pico 12 com fragmento (m/z 229 [$M-H$] $^{-}$, $C_{12}H_{5}O_5^{-}$) foi identificado como o ácido elágico (Riehle et al., 2014).

O pico 13 (m/z 447,0585 [$M-H$] $^{-}$, $C_{20}H_{15}O_{12}^{-}$) com íon fragmento de m/z 300 [$M-H$] $^{-}$ ($C_{14}H_5O_8^{-}$) foi identificado como ácido O-metil-O-pentosil-elágico com fragmento m/z 300 [$M-H$] $^{-}$, $C_{14}H_5O_8^{-}$ e o pico 14 (m/z 447,0584 [$M-H$] $^{-}$, $C_{20}H_{15}O_{12}^{-}$) com íon fragmento de m/z 315 [$M-H$] $^{-}$, $C_{15}H_5O_8^{-}$ foi identificado como ácido O-deoxihexosil-elágico, com fragmento (315 [$M-H$] $^{-}$, $C_{15}H_5O_8^{-}$) equivale a perda de um resíduo de hexose com diferença de 15 μ (CH_3) (Álvaréz-Fernández et al., 2015; Santos et al., 2013; Aab et al., 2007; Ambigaipalan et al., 2017).

O pico 15 (m/z 461,0732 [$M-H$] $^{-}$, $C_{21}H_{17}O_{12}^{-}$) com UV e fragmentos característicos de derivados de ácido elágico, foi putativamente identificado como O-metil-O-pentosil-ácido elágico (Álvaréz-Fernández et al., 2015).

O pico 17 (m/z 599,0687 [$M-H$] $^{-}$, $C_{34}H_{15}O_{11}^{-}$) apresentou os íons fragmentos de m/z 447, $C_{20}H_{15}O_{12}^{-}$ e 301 [$M-H$] $^{-}$, $C_{14}H_5O_8^{-}$), sem dados de UV (atribuído a baixa

concentração), porém devido ao fragmento de m/z 301 $[\text{M}-\text{H}]^-$ ($\text{C}_{14}\text{H}_5\text{O}_8^-$) correspondem com a massa e fórmula do ácido elágico identificado este pico como um derivado do ácido elágico.

Os picos 17 a 35 do cromatograma foram caracterizados apenas em nível 4, sugerindo que esses compostos pertencem à classe das saponinas triterpênicas por apresentarem características como ausência do UV e massa molecular elevada, nesta classe o UV tem pouca importância, pois normalmente estes compostos não apresentam cromóforos.

O pico 24 (m/z 1019,5104 $[\text{M}-\text{H}]^-$, $\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{O}_{22}^-$) apresentou íons fragmentos de m/z 973 ($\text{C}_{48}\text{H}_{77}\text{O}_{20}^-$), 811 ($\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{O}_2^-$), 583 ($\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{O}_7^-$), 487 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_5^-$), e o pico 29 (m/z 1003,5160 $[\text{M}-\text{H}]^-$, $\text{C}_{49}\text{H}_{80}\text{O}_{21}^-$) apresentou os íons fragmentos de m/z 957 ($\text{C}_{48}\text{H}_{78}\text{O}_{19}^-$), 795 ($\text{C}_{42}\text{H}_{67}\text{O}_{14}^-$), 567 ($\text{C}_{35}\text{H}_{51}\text{O}_6^-$) e 471 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4^-$), sendo que os fragmentos de m/z 487 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_5^-$) e 471 ($\text{C}_{30}\text{H}_{47}\text{O}_4^-$) são relativos as agliconas triterpênicas, assim estes compostos são derivados triterpênicos (Luo et al., 2015; Mohammed et al., 2016).

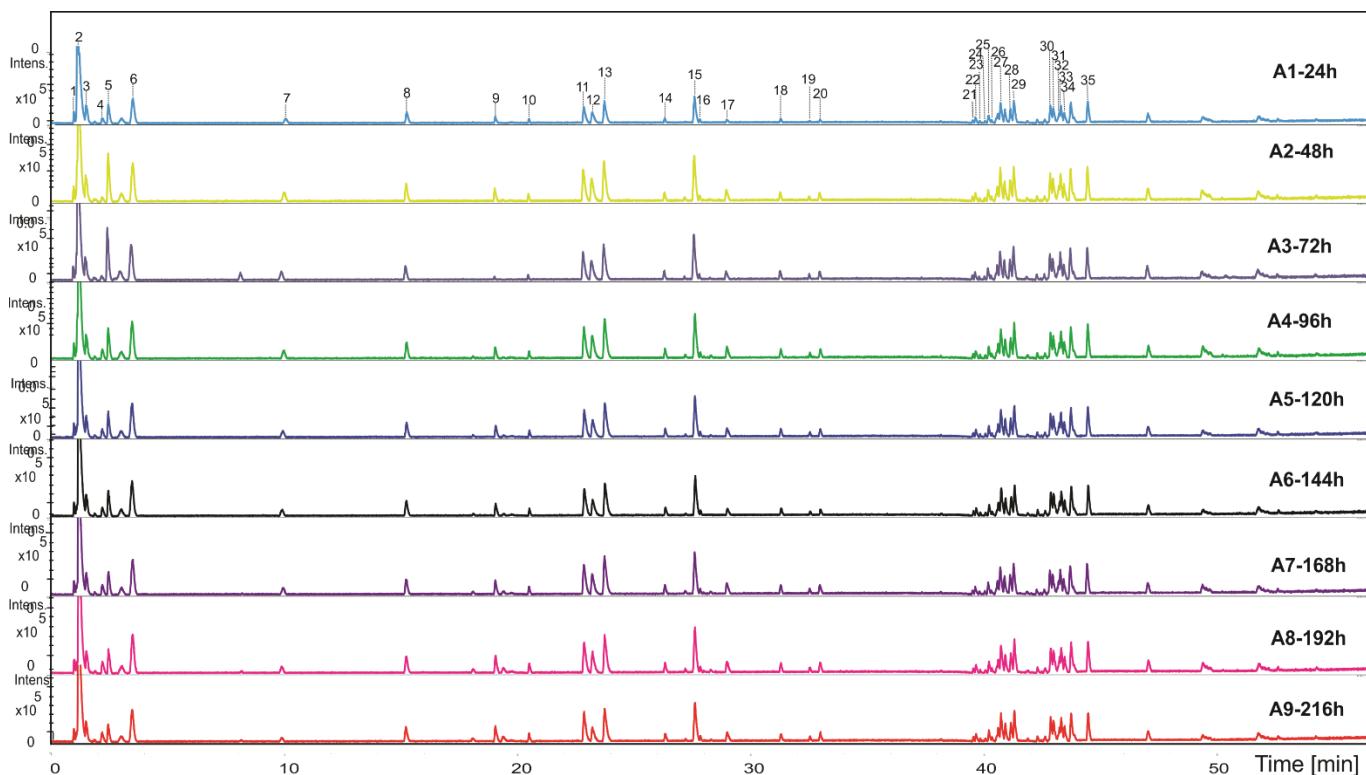


Figura 3: Perfil químico do extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* (EACb). Cromatogramas de íons totais apresentando os perfis químico de nove

extratos aquosos obtidos nos tempos de extração 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 192 e 216 h.

Tabela 2: Compostos identificados por CLAE-DAD-EM a partir do extrato aquoso da raiz de *C. brasiliense* (EACb). Dados cromatográficos, massa sobre carga (*m/z*) e fragmentos (MS/MS) de compostos identificados no extrato aquoso das raízes de *C. brasiliense*

Picos	Composto proposto	NI	RT (min)	[M-H] ⁻ (<i>m/z</i>)	F.M.	MS/MS fragmentos
1	Desconhecido	4	1	288,9357	-	---
2	Desconhecido	4	1,2	683,2256	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	341 (C ₁₂ H ₂₁ O ₁₁ ⁻); 179 (C ₆ H ₁₁ O ₆ ⁻)
3	Desconhecido	4	1,5	485,0613	C ₁₉ H ₁₈ O ₁₅	---
4	Ácido O-hexosil galoil	3	2,2	331,0692	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	169 (C ₇ H ₅ O ₅ ⁻)
5	Ácido gálico	1	2,5	169,0149	C ₇ H ₆ O ₅	---
6	Ácido O-hexosil galoil	3	3,5	331,068	C ₁₃ H ₁₆ O ₁₀	169 (C ₇ H ₅ O ₅ ⁻)
7	Derivado do ácido gálico	3	10	637,0709	C ₂₆ H ₂₂ O ₁₉	---
8	Ácido O-hexosil digaloil	3	15,2	483,0778	C ₂₀ H ₂₀ O ₁₄	313 (C ₁₃ H ₁₃ O ₉ ⁻); 241 (C ₁₀ H ₉ O ₇ ⁻); 169 (C ₇ H ₅ O ₅ ⁻)
9	Derivado de tanino	3	19	625,0632 ²⁻	C ₅₃ H ₄₀ O ₃₆	301(C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻);169(C ₇ H ₅ O ₅ ⁻)
10	Derivado de tanino	3	20,5	8010,829	C ₃₄ H ₂₆ O ₂₃	633 (C ₂₀ H ₂₅ O ₂₃ ⁻); 425 (C ₉ H ₁₃ O ₁₉ ⁻);300 (C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻)
11	Ácido O-pentosil elágico	3	22,9	433,0445	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	433 (C ₁₉ H ₁₃ O ₁₂ ⁻); 301 (C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻)
12	Ácido elágico	1	23,2	301,0001	C ₁₄ H ₆ O ₈	229 (C ₁₂ H ₅ O ₅ ⁻)
13	Ácido O-metil-O-pentosil elágico	3	23,7	447,0585	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	300 (C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻)
14	Ácido O-deoxihexosil-elágico	3	26,3	447,0584	C ₂₀ H ₁₆ O ₁₂	315 (C ₁₅ H ₅ O ₈ ⁻); 300 (C ₁₄ H ₅ O ₈)
15	Ácido O-metil-O-pentosil elágico	3	27,6	461,0732	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₂	315 (C ₁₅ H ₅ O ₈ ⁻)
16	Derivado do ácido elágico	4	29	599,0687	C ₃₄ H ₁₆ O ₁₁	447(C ₂₀ H ₁₅ O ₁₂ ⁻);301 (C ₁₄ H ₅ O ₈ ⁻)
17	Desconhecido	4	31,3	503,0856	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	---
18	Desconhecido	4	32,5	503,083	C ₂₃ H ₂₀ O ₁₃	---
19	Desconhecido	4	33	613,0869	C ₂₁ H ₂₆ O ₂₁	---
20	Desconhecido	4	39.5	1297,6088	C ₆₀ H ₉₈ O ₃₀	---
21	Desconhecido	4	39.7	1267,5960	C ₅₉ H ₉₆ O ₂₉	---
22	Desconhecido	4	39.9	1181,5626	C ₅₅ H ₉₀ O ₂₇	---
23	Desconhecido	4	40,1	1151,5532	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₆	---
24	Derivado triterpênico	4	40,2	1019,5104	C ₄₉ H ₇₉ O ₂₂	973 (C ₄₈ H ₇₇ O ₂₀ ⁻); 811 (C ₄₂ H ₆₇ O ₂ ⁻); 583 (C ₃₅ H ₅₁ O ₇ ⁻);487 (C ₃₄ H ₄₇ O ₂ ⁻),
25	Desconhecido	4	40.3	1135,5578	C ₅₄ H ₈₈ O ₂₇	---

26	Desconhecido	4	40,3	1105,5449	C ₄₆ H ₉₀ O ₂₉	---
27	Desconhecido	4	40,9	1165,5994	C ₄₈ H ₉₄ O ₃₁	---
28	Desconhecido	4	41,2	1135,5578	C ₅₃ H ₈₆ O ₂₃	---
29	Derivado triterpênico	4	41,3	1003,5160	C ₄₉ H ₈₀ O ₂₁	957 (C ₄₈ H ₇₈ O ₁₉ ⁻); 795 (C ₄₂ H ₆₇ O ₁₄ ⁻); 567 (C ₃₅ H ₅₁ O ₆ ⁻); 471 (C ₃₀ H ₄₇ O ₄ ⁻)
30	Desconhecido	4	42,9	1103,5302	C ₅₃ H ₈₄ O ₂₄	---
31	Desconhecido	4	43	1265,5791	C ₅₉ H ₉₄ O ₂₉	---
32	Desconhecido	4	43,2	1235,5719	C ₅₈ H ₉₂ O ₂₈	-
33	Desconhecido	4	43,3	971,4826	C ₄₈ H ₇₆ O ₂₀	---
34	Desconhecido	4	43,5	1103,532	C ₄₆ H ₈₈ O ₂₉	---
35	Desconhecido	4	44,4	809,4332	C ₄₂ H ₆₆ O ₁₅	---

NI: nível de identificação; TR: Tempo de retenção; FM: Fórmula molecular; UV: espectro ultravioleta
 Ácido O-metil-o-pentosil elágico

3.5. Quantificação de compostos fenólicos e taninos totais do extrato aquoso de *C. brasiliense* (EACb)

O EACb apresentou em média 60 mg/g, referente a 6,1 % de compostos fenólicos totais e 50 mg/g, referente a 5,0 % de taninos totais em equivalentes de ácido gálico.

3.6. Determinação da atividade antioxidante através do método de sequestro de radicais livres (DPPH) do extrato aquoso de *C. brasiliense* (EACb)

O extrato EACb demonstrou potencial de sequestrar radicais livres apresentando IC_{50} de $16,15 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$, o mesmo foi comparado com a quercetina que apresentou IC_{50} de $1,73 \pm 0,10 \mu\text{g/mL}$.

3.7. Ensaios biológicos

3.8. Efeito de toxicidade do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*

O EACb não foi tóxico aos nematódeos após 24 h (Figura 4 A) e 48 h (Figura 4 B) de incubação nas concentrações avaliadas (7,5 – 1000 $\mu\text{g/mL}$).

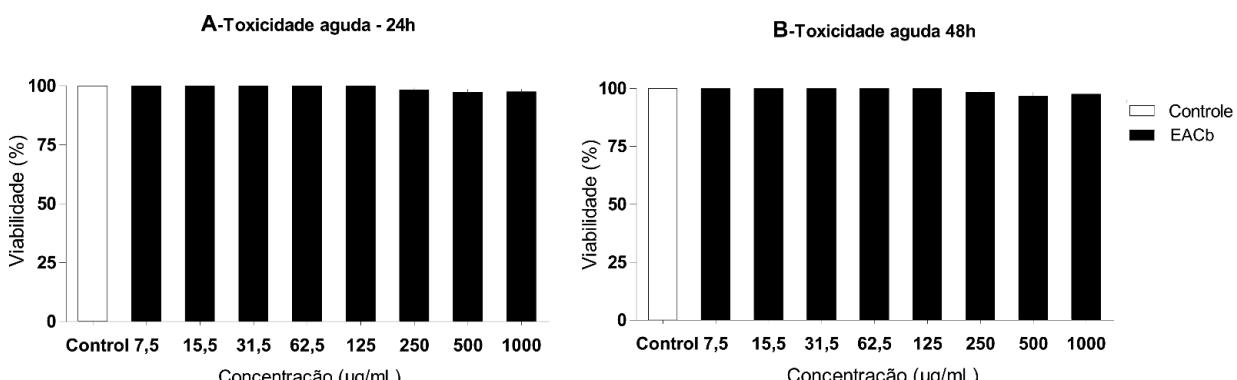


Figura4: Toxicidade *in vivo* em *Caenorhabditis elegans*. O extrato aquoso de *C. brasiliense* (EACb) contra *C. elegans* incubado por 24 h (A) e 48 h (B).

3.9. Efeito anti-inflamatório

3.9.1. Efeito do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre o edema de pata induzido por carragenina

A carragenina 1% induziu edema de pata em todos os horários avaliados de 30, 60, 120 e 240 minutos. O pré-tratamento com EACb diminuiu o volume da pata já nos primeiros horários (30 e 60 minutos) nas doses de 16 mg/Kg (0.050 ± 0.007) e 40 mg/Kg (0.049 ± 0.011), o que significa uma diminuição de aproximadamente 30% em relação ao controle não tratado (0.072 ± 0.007), este efeito foi próximo ao da indometacina (0.047 ± 0.007). Nos tempos de 120 e 140 min os efeitos se mantiveram nas doses de 16 mg (0.032 ± 0.012) e de 40 mg (0.027 ± 0.010) (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito do pré-tratamento com o extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* (EACb) sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de Carragenina. A dose de 16 mg/Kg é a baseada na utilização popular.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Edema de pata (mL) e inibição (%)							
		30 min	(%)	60 min	(%)	120 min	(%)	240 min	(%)
Veículo (água)		0.072 ± 0.007	-	0.070 0.012	\pm -	0.047 0,002	\pm -	0.050 0.004	\pm -
Indo	15	0.047 ± 0.007	34.0*	0.058 0.008	\pm 17.1	0.048 0.004	\pm -	0.053 0.005	\pm -
EACb	1	0.072 ± 0.007	-	0.050 0.007	\pm 28.6	0.052 0.013	\pm -	0.055 0.018	\pm -
EACb	16	0.050 ± 0.007	30.6	0.048 0.017	\pm 31.4	0.032 0.012	\pm 31.9	0.058 0.014	\pm -
EACb	40	0.049 ± 0.011	31.9	0.034 0.015	\pm 51.4**	0.027 0.010	\pm 42.6*	0.060 0.010	\pm -

Os animais (n=5 animais/grupo) foram pré-tratados com água, indometacina(Indo) ou extrato aquoso das raízes de *Caryocar brasiliense* (EACb), v.o., 60 min antes do estímulo. O edema foi avaliado em diferentes períodos após a administração de Cg 1 %. Anova de duas vias, seguido pelo teste de Bonferroni, * $P<0.05$ e ** $P<0.01$ quando comparado ao grupo que recebeu o veículo.

3.9.2. Efeito do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre o infiltrado leucocitário para a cavidade peritoneal de camundongos induzido por carragenina

Após quatro horas da injeção i.p. de Cg 1% causou um aumento no número de leucócitos mononucleares (MN) ($2399 \pm 298,5$ MN/mm³) para a cavidade peritoneal dos camundongos quando comparado ao grupo que recebeu solução salina 0,9 % ($1940 \pm 249,7$ MN/mm³). Não houve redução da migração dos MN para a cavidade peritoneal após o pré-tratamento com o anti-inflamatório indometacina ($1990 \pm 489,1$ MN/mm³) e nem com EACb 1 ($2035 \pm 265,0$ MN/mm³), EACb 16 ($1292 \pm 262,6$ MN/mm³) e EACb 40 ($1204 \pm 210,2$ MN/mm³).

Na análise do infiltrado de células polimorfonucleares (PMN) observou-se que a injeção de Cg 1% induziu o aumento do número dessas células ($2212 \pm 282,6$ PMN/mm³) quando comparado ao grupo que recebeu solução salina 0,9 % ($97,3 \pm 19,6$ PMN/mm³). A indometacina inibiu o influxo de PMN em 51,3 % e o pré-tratamento com EACb também foi eficaz na redução do número dessas células inibindo 30,3 % de 1 mg/kg; 60,8 % 16 mg/kg e 74,2 % 40 mg/kg.

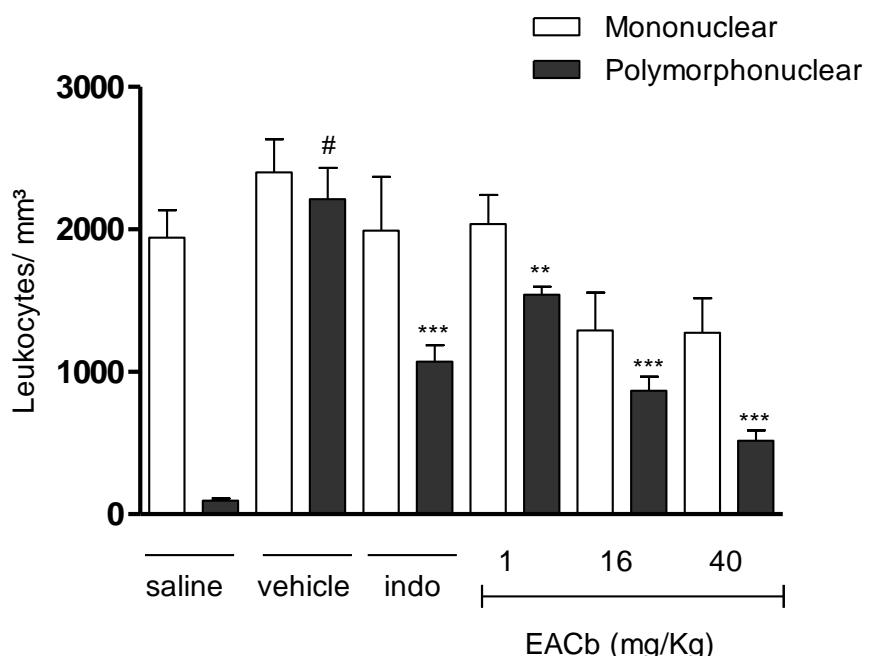


Figura 5: Efeito do tratamento com extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACB) sobre o influxo de leucócitos induzido por carragenina 1% (Cg). Os

animais foram pré- tratados com água, EACb ou indometacina (Indo), v.o., 60 minutos antes da injeção de Cg. Após 4 horas foi avaliado o influxo, leucócitos mononucleares (**MN**) e polimorfonucleares (**PMN**). Resultados expressos como média \pm EPM (n= 6). ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. $\#p < 0,05$ (comparado ao grupo que recebeu salina); $*p < 0,05$; $**p < 0,01$; $***p < 0,001$ (comparado ao grupo que recebeu Cg).

3.10. Efeito anti-hiperalgésico

3.10.1. Efeito do extrato aquoso de *Caryocar brasiliense* (EACb) sobre a contorção abdominal induzida pelo ácido acético

A injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% induziu $75,3 \pm 11,5$ contorções nos animais que receberam água (controle negativo). O tratamento com anti-inflamatório padrão (Indometacina 15 mg/Kg; controle positivo) reduziu o número de contorções em 92,0 % ($6,0 \pm 4,2$ contorções). O EACb na dose de 1 mg/Kg não foi eficaz nesta redução, enquanto as doses de 16 mg/Kg e 40 mg/Kg inibiram em 60,8 % ($29,5 \pm 7,9$ contorções) e 70,3 % ($22,4 \pm 7,6$ contorções), respectivamente (Figura 5).

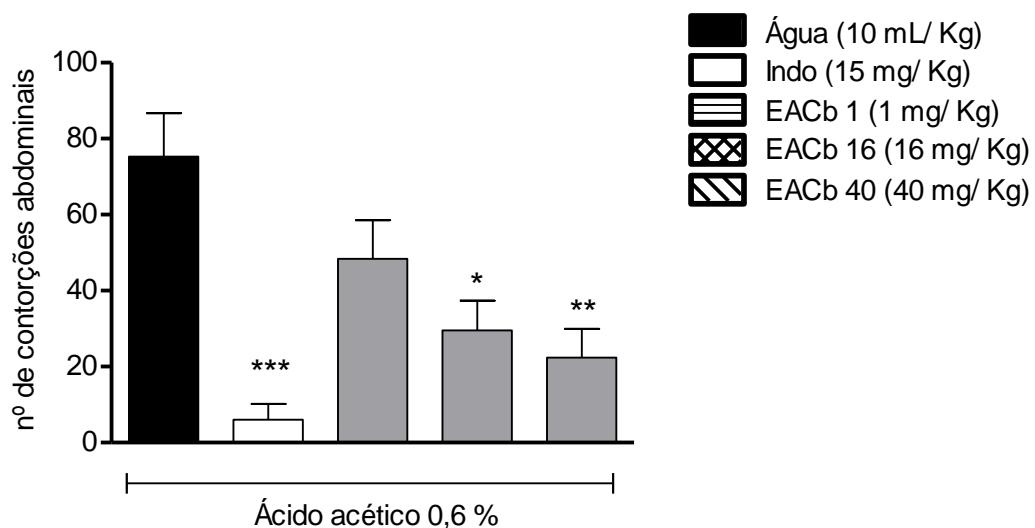


Figura 6: Efeito do pré-tratamento com o (EACb) sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Os animais foram pré-tratados 60 min antes do estímulo, v.o. com água, indometacina (Indo) ou EACb (n = 5 animais/grupo). Após, receberam o estímulo – injeção via i.p. de ácido acético 0,6% (10 mL/Kg) e o número de contorções foi registrado durante 30 min. Os resultados

foram expressos como média \pm EPM. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (comparado ao grupo tratado com água). ANOVA seguida pelo teste de Tukey.

4. Discussão

No presente estudo pela primeira vez a utilização popular das cascas da raiz do pequi foi avaliada por métodos científicos baseados na etnobotânica, sendo determinada sua estabilidade química, capacidade antioxidante, efeitos tóxicos e a realização de testes farmacológicos para avaliar a atividade anti-inflamatória e anti-hiperalgésica.

O pequi é utilizado em comunidades tradicionais do cerrado, como os índios da etnia Kuikuro que consomem o pequi na alimentação e celebram a colheita do fruto (Smith e Fausto, 2016) como também em comunidades regionais. Ribeiro et al. (2017), relataram a utilização da raiz do pequi em uma comunidade ribeirinha do Araguaia (Mato Grosso, Brasil) em tratamentos medicinais como infecções gerais, dor de ouvido, asma, bronquite, expectorante, pneumonia, dor de estômago, fissuras nas mãos e nos pés, dores nas costas e rins.

Entretanto, pela primeira vez foi relatado o modo de preparação da raiz do pequi. As informações obtidas com os entrevistados da forma de preparo, do tempo de utilização, foram seguidas no ensaio de estabilidade dos compostos. Permitindo verificar que a forma de utilização popular não interfere na composição química, e que ao longo de sete dias (168 horas) a preparação fitoterápica demonstrou características químicas semelhantes e a partir deste período os compostos podem começar a degradar.

O extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* reproduzido segundo o método de preparo popular demonstrou um perfil químico variado, com compostos das classes dos taninos hidrolisáveis, derivados de ácidos gálico elágico, e saponinas triterpênicas. Assim como já encontrado no gênero *Caryocar* compostos fenólicos, triterpênicos, ácidos graxos e derivados de ácido gálico (Roesler et al., 2008; Figueiredo et al., 2016; Magid et al., 2008; Magid et al., 2006; Marx et al., 1997).

A presença de compostos como taninos, ácido elágico, ácido gálico, esteroides, triterpenoides, flavonoides, alcaloides e cumarinas, já foi relatada nas folhas de *C. brasiliense* (Coutinho, 2009; Lopes et al., 2011). Na região do epicarpo e mesocarpo externo dos frutos, já foram identificados: ácido gálico, ácido quínico e queracetina (Ascari et al., 2010; Roesler et al., 2008, Rocha et al., 2015).

O EACb demonstrou capacidade de sequestrar radicais livres apresentando IC_{50} de $16,15 \pm 0,77 \mu\text{g/mL}$, esse resultado pode ser relacionado a porcentagem da quantificação dos compostos fenólicos totais que foi de 6,1 % e 5,0% de taninos totais assim como em outros trabalhos apontam que a relação de compostos fenólicos e taninos encontrados em extratos vegetais aumentam o potencial antioxidante (Mustafa et al., 2010; Nahak et al., 2014). O efeito antioxidante é atribuído ao número de grupos hidroxilas encontrados no anel aromático característico de compostos fenólicos (Wang et al., 2003).

Na literatura diversos estudos demostram taxas inferiores a esta apresentada pelo EACb; Zheng e Whang (2001) apresentaram 12 ervas medicinais, destacando *Cantharantus roseus* com $2.85 \pm 0.11 \text{ mg/g}$ de fenóis totais (equivalentes de ácido gálico) e capacidade antioxidante de $22.30 \pm 0.54 \mu\text{mol}$ (equivalentes de Trolox). Outras plantas descritas na medicina popular como *Hypericum perforatum* L. apresentou taninos totais ($8,67 \pm 0,002 \text{ g/100 g}$) exibindo potencial antioxidante de $77,6\% \pm 0,5$ (Zheleva-Dimitrova et al., 2010). A avaliação das raízes de *Echinaceae* spp., espécies popularmente utilizadas como anti-inflamatórias, obteve $23.23 \pm 0.33 \text{ mg/g}$ de fenóis totais, identificando um composto fenólico chamado echinoside que demonstrou IC_{50} $6.6 \pm 0,7 \mu\text{M}$ (Pellati et al., 2004). Assim, esta alta capacidade antioxidante pode ser explorada em futuros trabalhos e contribuir para as atividades aqui observadas.

O EACb não apresentou efeitos tóxicos ou letais em modelo *C. elegans*. O nematóide *C. elegans* é um modelo experimental bem utilizado para se obter resultados rápidos em estudos farmacológicos de toxicidade devido ao ciclo de vida curto, alta taxa de reprodução e representar um organismo multicelular (Dengg et al., 2004). Em um trabalho de Lima et al. (2014), compostos fenólicos presentes no extrato de *Ilex paraguariensis* A. ST. Hil exibiu efeitos protetores em *C. elegans*, aumentando a vida útil do nematóide, isto pode indicar que compostos fenólicos encontrados no EACb podem ser os responsáveis causando um efeito protetor e não tóxico.

Em estudos etnofarmacológicos o extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* demonstrou atividade anti-inflamatória diminuindo edema de orelha, efeito que foi atribuído a presença de compostos fenólicos antioxidantes

que podem ter ação redutora de agentes oxidativos, responsáveis por induzirem estresse oxidativo e liberação de citocinas (Araruna et al., 2014).

Apesar de o óleo dos frutos de *C. brasiliense* já ter demonstrado atividade anti-inflamatória em tecidos hepáticos, diminuindo a concentração de interleucinas (IL-6) e leucotrienos (LTB-4) (Torres et al., 2006). Esta é a primeira vez que ações anti-inflamatória e anti-hiperalgésica em dose similar as utilizadas popularmente da casca da raiz de *C. brasiliense* estão sendo demonstradas.

O extrato aquoso da casca da raiz de *C. brasiliense* (EACb) reduziu o edema nos tempos iniciais do experimento, mantendo o efeito de redução do edema de pata nas horas posteriores. O pré-tratamento com EACb após quatro horas também diminuiu significativamente o número de células polimorfonucleares na cavidade peritoneal dos camundongos.

No teste de edema de pata segundo Di Rosa e colaboradores, 1971a, os primeiros 60 minutos da resposta inflamatória aguda induzida pela carragenina são caracterizados por eventos de aumento da permeabilidade vascular e liberação de histamina, serotonina e bradicinina. A partir da segunda hora ocorre o envolvimento de prostaglandinas (PG), (Posadas et al., 2001a, Di Rosa et al., 1971b) da enzima ciclo-oxigenase (COX-2) e óxido nítrico (NO), produzindo os sinais clássicos de uma inflamação como edema, vermelhidão, calor e dor (Seibert et al., 1994).

A produção de prostaglandinas são ativadas pela ação da enzima ciclo-oxigenase (COX) através da via enzimática do ácido araquidônico (Vane e Botting, 1995). As prostaglandinas principalmente as prostaglandinas (PGE-2 e PG12) atuam na vasodilatação do músculo liso vascular, estimulam citocinas, e sensibilizam nociceptores periféricos induzindo dor inflamatória (Kidd e Urban, 2001).

Na fase celular, as células polimorfonucleares migram para o local da inflamação por meio de eventos desencadeados por mediadores quimiotáticos derivados da lipo-oxigenase (5-LOX), leucotrienos (LTB-4), fator de necrose tumoral (TNF_α) e interleucinas IL-1, IL-8 (Beck et al., 1997). Os leucotrienos induzem o aumento da produção de espécies reativas de oxigênio, citocinas pró-inflamatórias como TNF-α, apoptose celular e reduz a proliferação celular (Funk, 2001).

Larrosa et al. (2010) listaram compostos derivados de galatoninos e elagitaninos com potencial anti-inflamatório. O composto punicalagin, apresenta efeito de inibição do oxídrico nítrico (NO), interleucinas (IL-6) e (IL-1 β) e fator de necrose tumoral (TNF- α) (Xu et al., 2014). O geranin um derivado de elagitanino inibiu a enzima oxido nítrico sintase induzível (iNOs) e oxido nítrico (NO) (Pan et al., 2000). Derivado de galatonino teve ação de inibição de enzimas e citocinas iNOS, COX-2, TNF- α , IL-1 β , da produção de NO e PGE-2 e inibição da proteína nuclear-Kappa - β (NF-K β) responsável pela regulação genética de citocinas pró-inflamatórias (Na et al., 2006).

As saponinas triterpênicas identificadas no EACb, compostos conhecidos por aumentarem a solubilidade e biodisponibilidade de outros compostos bioativos (Cote et al., 2004;), podem estar relacionados a atividade anti-inflamatória, por apresentarem ação de inibição de níveis de mediadores pró-inflamatórios como o TNF- α , IL-6, expressão de COX-2 inibindo liberação de PGE-2 (Wan, et al., 2012) e diminuindo a ação de NO (Thao, et al., 2010; Wu et al 2011).

Os extratos de *Mangifera indica* e *Punica granatum*, popularmente utilizados em processo inflamatórios, são ricos em galotaninos e elagitaninos, respectivamente (Kim et al., 2016). A atividade anti-inflamatória destas espécies está relacionada com a inibição de enzimas como a COX-2 e iNOs e de citocinas como o TNF- α (Marquéz et al., 2010; Rosillo et al., 2012).

A avaliação do extrato de *Geranium robertianum* rico em elagitaninos apontou atividade anti-inflamatória devido ao seu potencial antioxidante e de inibição de NO (Catarino et al., 2017). O extrato das sementes de framboesa preta apresentaram atividade antioxidante e anti-inflamatória por inibição de NO, apresentando elagitaninos como compostos majoritários.(Park et al., 2014).

Foi verificado a ação anti-inflamatória do ácido elágico em lesões pulmonares aguda de camundongos, por meio da redução dos produtos induzidos por COX-2 sendo este resultado comparados aos efeitos do medicamento glucocorticoide dexametasona amplamente utilizado em processos inflamatórios por agir na regulação de genes responsáveis pela indução de COX-2 e iNOS levando a inibição da produção de prostaglandinas e citocinas (Favarin et al., 2013; Tsurufuji e Takemasa, 1979). A enzima iNOs está presente durante reações inflamatórias induzindo a produção de NO que atua no aumentando da

permeabilidade vascular em tecidos de vasos sanguíneos, podendo causar dano tecidual e citotoxicidade celular (Radomski e Salas, 1995).

O ácido acético quando injetado na cavidade peritoneal dos camundongos ativam diretamente fibras nociceptivas aferentes primárias ou indiretamente iniciam uma inflamação sensibilizando os nociceptores mediado por substâncias como prostaglandinas, serotonina, bradicinina, histamina liberadas por mastócitos e neutrófilos, além de citocinas (IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α) liberadas por macrófagos residentes (Ballou et al, 2000; Ribeiro et al, 2000; Basbaum, 2001).

O pré-tratamento com EACb diminuiu o número de contorções nos animais, este efeito pode ser relacionado aos compostos derivados de ácido gálico e elágico presentes no EACb. Nesse sentido, Moreira et al. (2013) isolaram corilagin um composto derivado de tanino hidrolisável da espécie *Phyllanthus niruri* utilizada popularmente em processos de dor, ao ser testada diminuiu o número de contorções abdominais indiretamente em camundongos atuando como anti-inflamatório por inibir NO.

5. Conclusão

Com os dados etnofarmacológicos foi possível determinar o modo de preparo popular do extrato da casca da raiz do pequi. Sendo possível determinar que o tempo de uso popular não leva a alterações químicas significativas. Podemos considerar o EACb um excelente antioxidante e isto pode estar relacionado a quantidade de fenóis e taninos. Além do mais, este extrato não apresentou efeitos tóxicos em modelo de *C. elegans*. Já o efeito anti-inflamatório e anti-hiperalgesico verificado pode ser relacionado aos compostos identificados no perfil químico, principalmente os derivados de ácido gálico e elágico. Esses resultados podem indicar que a utilização popular da casca da raiz do pequi pode ser fundamentado e relacionado aos compostos presentes no EACb e os testes avaliados neste estudo, dando suporte a utilização popular e contribuindo para o registro e proteção do conhecimento popular.

6. Agradecimentos

Os autores agradecem a Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) pela estrutura proporcionada e a Coordenadoria de aperfeiçoamento e pesquisa (CAPES) pelo apoio financeiro.

7. Referências bibliográficas

- Aaby, K., Ekeberg, D., Skrede, G., 2007. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *J. Agric. Food Chem.*, 55, 4395-4406.
- Ambigaipalan, P., de Camargo, A. C., Shahidi, F., 2017. Identification of phenolic antioxidants and bioactives of pomegranate seeds following juice extraction using HPLC-DAD-ESI-MSn. *Food chem.* 221, 1883-1894.
- Almeida, S.P., Silva, J.A., 1994. Piqui e buriti: importância alimentar para a população dos cerrados. *Embrapa-Cpac* 7-8.
- Álvarez-Fernández, M.A., Cerezo, A.B., Canete-Rodríguez, A.M., Troncoso, A.M., García-Parrilla, M.C., 2015. Composition of nonanthocyanin polyphenols in alcoholic-fermented strawberry products using LC – MS (QTRAP), High- Resolution MS (UHPLC-Orbitrap-MS), LC-DAD, and antioxidant activity. *Agric. food Chem.* 63, 2041–2051.
- Araruna, M.K., Saraiva, R.E. A., Nogara, P.A., Rocha, J.B., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Rodrigues, L.M, Costa. R.H.S., Santana, F.R.A., Costa, J.G.M, Coutinho, H.D. M., Pinheiro, P.G, Kerntopf, M.K., Wanderley, A.C., Menezes, I.R.A, 2014. Effect of pequi tree *Caryocar coriaceum* Wittm. leaf extracts on different mouse skin inflammation models: inference with their phenolic compound content. *Afri. J. Phar. Pharmacol.* 8, 629-637.
- Araujo, F.D., 1995. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) - an economically valuable species of the central brazilian cerrados. *Econ. Bot.* 49, 40-48.
- Ballou, L.R.; Botting, R.M.; Goorha, S.; Zhang, J.; Vane, J.R., 2000. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 10272–10276.
- Basbaum, A.I.; Bautista, D. M.; Scherrer, G.; Julius, D., 2009. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139, 267-284.
- Batlouni, M., 2010. Anti-inflamatórios não esteroides: efeitos cardiovasculares, cérebro-vasculares e renais. *Arq. Bras. Cardiol.* 94, 556-63.
- Bitu, V.D.C.N., Bitu, V.D.C.N., Matias, E.F.F., Lima, W.P., Costa-Portelo, A., Coutinho, H.D.M., Menezes, I.R.A., 2015. Ethnopharmacological study of plants sold for therapeutic purposes in public markets in Northeast Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 172, 265-272.
- Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *J. Nat. Prod.* 67, 2141-2153.

- Catarino, M.D., Silva, A.M.S., Cruz, M.T., Cardoso, S.M., 2017. Antioxidant and anti-inflammatory activities of *Geranium robertianum* L. decoctions. *Food Funct.* 8, 3355–3365
- Cote, C.S., Kor, C., Cohen, J., Auclair, K., 2004. Composition and biological activity of tradicional and commercial kava extracts. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 322, 147-152.
- Chong, J., Soufan, O., Li, C., Caraus, I., Li, S., Bourque, G., Wishart, D.S., Xia, J., 2018. MetaboAnalisty 4.0: towards more trasnparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Res.* 2018.
- Dengg, M., Van-Meel, J.C.A, 2004. "Caenorhabditis elegans as model system for rapid toxicity assessment of pharmaceutical compounds." *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 50.3, 209-214.
- Di Rosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971b. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J. Pathol.* 104, 15-29.
- Di Rosa, M.D., Papadimitriou, J. M., Willoughby, D., 1971a. A histopathological and pharmacological analysis of the mode of action of non-steroidal anti-inflammatory drugs. *J. Pathol.* 105, 239-256.
- Dinda, B., Debnath, S., Mohanta, B. C., Harigaya, Y., 2010. Naturally occurring triterpenoid saponins. *Chem. Biodivers.* 7, 2327-2580.
- Favarin, C.D., Teixeira, M.M., Andrade, E.L., Alves, C.F., Chica, J.E.L., Sorgi, C.A., Faccioli, L.H., Rogerio, A.P., 2013. Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. *Mediators of inflamm.* 2013, 2013.
- Fukumoto, L. R. and Mazza, G., 2000. Assessing antioxidant and prooxidant activities of phenolic compounds. *J. Agric. Food Chem.* 48, 3597-3604.
- Giacomini, F., Pier, G., Vieira, E., Leite, S., Lechtenberg, M., Petereit, F., Carlos, J., Mello, P., Hensel, A., 2014. Fitoterapia hydrolyzable tannins from hydroalcoholic extract from *Poincianella pluviosa* stem bark and its wound-healing properties: phytochemical investigations and in fluence on in vitro cell physiology of human keratinocytes and dermal fibroblasts. *Fitoterapia.* 99, 252–260.
- Giuletti, A., Harley, R.M., Queiroz, L.P., Wanderley, M.D.G.L., Van Den Berg, C., 2005. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. *Conserv. Bio.* 19, 632-639.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol. Asp. Med.* 27,1–93.

Herald, T.J., Gadgil, P., Tilley, M., 2012. High-throughput micro plate assays for screening flavonoid content and DPPH-scavenging activity in sorghum bran and flour. *J. Sci. Food Agric.* 92, 2326–2331

Hurrel, J.A., Pochettino, M.L., 2014. Urban ethnobotany:theoretical and methodological contributions, in: Albuquerque, U.P., Cunha, L.V.F.C., Lucena, R.F.P., Alves, R.R.N., 2014. *Methodos and techniques in etnobiology and etnoecology*, 1, 1-465.

Kahnkonen, M.P., Hopia, A.I., Vuorela, H.J., Rauha, J., Pihlaja, K., Kujala, T.S., Heinonen, M., 1999. Comparison of the nutritive value, antioxidant and antibacterial activities of *Sonchus asper* and *Sonchus oleraceus*. *J. Agric. Food Chem.* 47, 3954–3962.

Kim, H., Banerjee, N., Ivanov, I., Pfent, C.M., Prudhomme, K.R., Bisson, W.H., Dashwood, R.H., Talcott, S.T., Mertens-Talcott, S.U., 2016. Comparison of anti-inflammatory mechanisms of mango (*Mangifera Indica* L.) and pomegranate (*Punica Granatum* L.) in a preclinical model of colitis. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1912–1923

Kiss, A. K., Piwowarski, J.P., 2016. Ellagitannins, gallotannins and their metabolites-The contribution to the anti-inflammatory effect of food products and medicinal plants. *Curr. Med.Chem.* 23, 1-22.

Koster, R., Andersons, M., Debber, E.J., 1959. Acetic acid analgesic screening. *Federation Proceedings.* 18, 418–420

Kuskoski, E.M., Asuero, G.A., Troncoso, A.M., Mancini-Filho, J.; Fett, E.T.T.R., 20015. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutas. *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 25, 726-732.

Larrosa, M., García-Conesa, M.T., Espín, J.C., Tomás-Barberán, F.A., 2010. Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine*, 31, 513-539.

Legler, D. F., Bruckner, M., Uetz-von, A., E., Krause, P., 2010. Prostaglandin E2 at new glance: novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. *In. J. Biochem. Cell Bio.* 42, 198-201

Lewis, J.A. and J.T. Fleming,1995. “Basic culture methods,” in *Caenorhabditis Elegans: Modern biological analysis of an organism*, H. F. Epstein and D. C. Shakes, Eds., 3–29, Academic Press, San Diego, Calif, USA, 1995.

Lima, M.E., Colpo, A.C., Salgueiro, W.G., Sardinha, G.E., Ávila, D.S., Folmer, V., 2014. *Ilex paraguariensis* extract increases lifespan and protects against the toxic effects caused by paraquat in *Caenorhabditis elegans*. *In. J. Environ. Res. Public health.* 11, 10091-10104.

Lommen, A., 2009. MetAlign: interface-driven, versatile metabolomics tool for hyphenated full-scan mass spectrometry data preprocessing. *Anal. Chem.* 81, 3079–3086.

Luo, Y., Xu, Q.L., Dong, L.M., Zhou, Z.Y., Chen, Y.C., Zhang, W.M., Tan, J.W., 2015. A new ursane and a new oleanane triterpene acids from the whole plant of *Spermacoce latifolia*. *Phytochem. Lett.* 11, 127–131.

Mammela, P., Savolainen, H., Lindroos, L., Kangas, J., Vartiainen, T., 2000. Analysis of oak tannins by liquid chromatography-electrospray ionisation mass spectrometry. *J. Chromatography*. 891, 75–83.

Mena, P., Calani, L., Galaverna, G., Bruni, R., Crozier, A., Rio, D. Del, 2012. Rapid and comprehensive evaluation of (poly)phenolic compounds in Pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MS. *Molecules*. 17, 14821–14840.

Mohammed, H., Abdallah, I., Ibrahim, A., Gaber, A.E., Gendy, E., El-gawad, M.A., Omer, E.A., 2016. Anti-inflammatory, antipyretic, and antinociceptive effects of a *Cressa cretica* aqueous extract. *Planta Med.* 83, 1313–1320.

Moreira, J., Klein-Júnior, L.C., Filho, V., Buzzi, F.C., 2013. Anti-hyperalgesic activity of corilagin, a tannin isolated from *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae). *J. ethnopharmacol.* 146, 318-323.

Mustafa, R.A., Hamid, A.A., Mohamed, S., Bakar, F.A., 2010. Total phenolic compounds, flavonoids, and radical scavenging activity of 21 selected tropical plants. *J. of food science*, 75, 1.

Na, H.J., Lee, G., Oh, H.Y., Jeon, K.S., Kwon, H.J., Ha, K.S., Lee, H., Kwon, Y.G. Kim, Y.M., 2006. 4-O-Methylgallic acid suppresses inflammation-associated gene expression by inhibition of redox-based NF-κB activation. *Int. immunopharmacol.* 6, 1597-1608.

Nahak, G., Suar, M., Sahu, R.K., 2014. Antioxidant Potential and nutritional values of vegetables: A Review. *R. J. of Medicinal Plant*, 8, 50-81.

Palmeira, S.M., Silva, P.R., Ferrão, J.S., Ladd, A.A., Dagli, M.L., Grisolia, C.K., Hernandez-Blazquez, F.J., 2016. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. *Eur. J. Cancer Prev.* 25, 299-305.

Pan, M.H., Lin-Shiau, S.Y., Ho, C.T., Lin, J.H., Lin, J.K., 2000. Suppression of lipopolysaccharide-induced nuclear factor-κB activity by theaflavin-3, 3'-digallate from black tea and other polyphenols through down-regulation of IκB kinase activity in macrophages. *Biochem. Pharmacol.* 59, 357-367.

Paredes-Gamero E.J., Martins M.N.C., Cappabianco FAM, Ide, J.S., Miranda A., 2012. Characterization of dual effects induced by antimicrobial peptides: Regulated cell death or membrane disruption. *Biochim Biophys Acta.* 1820, 1062-1072.

Park, M., Cho, H., Jung, H., Lee, H., Hwang, K.T., 2014. Antioxidant and anti-inflammatory activities of tannin fraction of the extract from black raspberry seeds compared to grape seeds. *J. Food Biochem.* 38, 259–270.

Patay, E.B., Sali, N., Koszegi, T., Csepregi, V.L., Németh, T.S., Németh, T., Papp, N., 2016. Antioxidant potential, tannin and polyphenol contents of seed and pericarp of three *Coffea* species. *Asian Pacific J. Trop. Med.* 9, 366–371.

Patwardhan, B., 2005. Ethnopharmacology and drug discovery. *J. ethnopharmacol.* 100, 50-52.

Paula-Junior, W.D., Rocha, F.H., Donatti, L., Fadel-Picheth, C.M., Weffort-Santos, A.M., 2006. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of *Caryocar brasiliense* Cambess leaves hydroethanolic extract. *Rev. Bras. Farmacogn.* 16, 625-630.

Posadas, I., Bucci, M., Roviezzo, F., Rossi, A., Parente, L., Sautebin, L., Cirino, G., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br. J. Pharmacol.* 142, 331-338.

Rang, R., Ritter, J.M., Flower, R.J., Henderson, G., 2015. *Rang & Dale Farmacologia*. Elsevier Brasil.

Ribero, R.A.; Vale, M. L.; Thomazzi, S.M.; Paschoalato, A.B.P.; Poole, S.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q., 200. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *European J. Pharmacol.* 387, 111–118.

Ribeiro, R.V., Bieski, I.G.C., Balogun, S.O., Martins, D.T.O., 2017. Ethnobotanical study of medicinal plants used by ribeirinhos in the North Araguaia microregion, Mato Grosso, Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 205, 69–102.

Riehle, P., Rusche, N., Saake, B., Rohn, S., 2014. Influence of the leaf content and herbal particle size on the presence and extractability of quantitated phenolic compounds in *Cistus incanus* herbal teas. *J. Agric. Food. Chem.* 62, 10978-10988.

Roesler, R., Catharino, R.R., Malta, L.G., Eberlin, M.N., Pastore, G., 2008. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chem.* 110, 711-717.

Rosillo, M.A., Sánchez-Hidalgo, M., Cádeno, A., Aparício-Soto, M., Sánchez-Fidalgo, S., Villegas, I., La Lastra, C. A., 2012. Dietary supplementation of an ellagic acid-enriched pomegranate extract attenuates chronic colonic inflammation in rats. *Pharmacol. Res.* 66, 235-242.

Santos, S.A.O., Vilela, C., Freire, C.S.R., Neto, C.P., Silvestre, A.J.D., 2013. Ultra-high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. *J. Chromatogr. B* 938, 65-74.

Silva, I.A., Batalha, M.A., 2010. Woody plant species co-occurrence in Brazilian savannas under different fire frequencies. *Acta Oecologica*. 36, 85-91.

Souza, G.E., Ferreira, S.H., 1985. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents Actions*. 17, 97-103

Smith, M., Fausto, C., 2016. Socialidade e diversidade de pequis (*Caryocar brasiliense*, Caryocaraceae) entre os Kuikuro do alto rio Xingu (Brasil), *Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi, Ciênci. Hum.* 11, 87-113

Tavares, I.M. de C., Lago-Vanzela, E.S., Rebello, L.P.G., Ramos, A.M., Gómez-Alonso, S., García-Romero, E., Da-Silva, R., Hermosín-Gutiérrez, I., 2016. Comprehensive study of the phenolic composition of the edible parts of jambolan fruit (*Syzygium cumini* (L.) Skeels). *Food Res. Int.* 82, 1–13.

Thao, N.T.P., Hung, T.M., Cuong, T.D., Kim, J.C., Kim, E.H., Jin, S.E., Min, B.S., 2010. 28-Nor-oleanane-type triterpene saponins from *Camellia japonica* and their inhibitory activity on LPS-induced NO production in macrophage RAW264. 7 cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20, 7435-7439.

Tikunov, Y.M., Laptenok, S., Hall, R.D., Bovy, A., de Vos, R.C.H., 2012. MSClust: A tool for unsupervised mass spectra extraction of chromatography-mass spectrometry ion-wise aligned data. *Metabolomics* 8, 714–718.

Torres, L.R.O., De Santana, F.C., Torres-Leal, F.L., Melo, I.L., Yoshime, L.T., Matos-Neto, E. M., Seelaender, M.C.L., Araújo C.M.M., Cogliati, B., Mancini-Filho, J., 2016. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats, *Food Chem. Toxicol.* 97, 1597-1608.

Vincken, J.P., Heng, L., de Groot, A., Gruppen, H., 2007. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. *Phytochem.* 68, 275–297.

Xu, X., Yin, P., Wan, C., Chong, X., Liu, M., Cheng, P., Chen., J., Liu, F., Xu, J., 2014. Punicalagin inhibits inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPKs and NF- κ B activation. *Inflammation*, 37, 956-965.

Zheng, W., and Wang, S.Y., 2001. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5165-5170.

Zheleva-Dimitrova, D., Nedialkov, P., Kitanov, G., 2010. Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacogn. Mag.* 6, 74.

Wan, J., Gong, X., Jiang, R., Zhang, Z., Zhang, L., 2013. Antipyretic and anti-inflammatory effects of asiaticoside in lipopolysaccharide-treated rat through up-regulation of heme oxygenase-1. *Phytother. Res.* 27, 1136-1142.

Wang, M., Simon, J.E., Aviles, I.F., He, K., Zheng, Q.Y., Tadmor, Y., 2003. Analysis of antioxidative phenolic compounds in artichoke (*Cynara scolymus* L.). *J. Agric. Food Chem.* 51, 601-608.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Exp. Biol. Med.* 111, 544-547.

Wu, Q., Wang, Y., Guo, M., 2011. Triterpenoid saponins from the seeds of *Celosia argentea* and their anti-inflammatory and antitumor activities. *Chem. Pharm. Bull.* 59, 666-671.

Yazbek, P.B., Tezoto, J., Cassas, F., Rodrigues, E., 2016. Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. *J. Ethnopharmacol.* 179, 310–331.

8.Anexos

8.1.Termo de consentimento livre e esclarecido

Convidamos a Sr.^a ou Sr.^o , para participar da Pesquisa Estudo etnofarmacológico da atividade anti-inflamatória e analgésica das raízes do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess), sob a responsabilidade da pesquisadora Ellen Pereira da Silva Maciel, a qual pretende investigar o potencial medicinal da raiz do pequi. Sua participação é voluntária e se dará por meio de fornecimento de informações através de entrevista durante cerca de uma hora, sobre os métodos de utilização e tratamentos realizados com a raiz do pequi, tais informações não trarão nenhum prejuízo à pessoa entrevistada. Se você aceitar participar, estará contribuindo para a identificação dos compostos que possuem ação terapêutica da raiz desta espécie. Se depois de consentir em sua participação quiser desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo a sua pessoa. A/O Sr. não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação, a/o Sr. poderá entrar em contato com o pesquisador, pelo telefone (67)9130-9009 ou (67)3345-7366. Para perguntas sobre seus direitos como participante no estudo chame o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (067) 33457187.

Consentimento pós-informação

Eu, _____, fui informado sobre o que o pesquisador quer fazer e porque precisa da minha colaboração, e entendi a explicação. Por isso, eu concordo em participar do projeto, sabendo que não vou ganhar nada e que posso sair quando quiser. Este documento é emitido em duas vias que serão ambas assinadas por mim e pelo pesquisador, ficando uma via com cada um de nós.

Assinatura do participante

Assinatura do Pesquisador Responsável Data: ____/____/____ Campo Grande - MS
2017.

8.2. Roteiro de entrevista

FICHA ETNOFARMACOLÓGICA

A. Dados do entrevistado.

1. Idade _____ (em anos)

2. Sexo F () M ()

3. Há quanto tempo mora no local (comunidade, cidade):

4. Grau de escolaridade

a. () analfabeto b. () ensino fundamental incompleto c. () ensino fundamental completo

d. () ensino médio incompleto e. () ensino médio completo f. () superior incompleto

g. () superior completo

5. Renda - número de salários mínimos: a. () 1 () entre 2 e 3 () mais de 4

6. Qual é a sua ocupação?

Dados etnobotânicos

B. Preparo e utilização

1. Você conhece algum uso medicinal da árvore do pequi? a. () sim b. () não

2. Qual a parte da árvore do pequi você já utilizou? a. () raiz b. () caule c. () casca d. ()

e. () fruto f. () flor g. () outros

3. Você já utilizou/utilizou a raiz do pequi? a. () sim b. () não

4. Como você aprendeu ou quem lhe indicou a utilização da raiz do pequi em tratamentos medicinais?

a. () internet/tv b. () familiares c. () com raizeiros d. () com vizinhos/amigos

5. Onde ou como você adquire a raiz de pequi? a. () mercado/feira b. () familiares c. () raizeiros

d. () com vizinhos/amigos

6. Existe uma melhor época, horário do dia, ou lua, que você indica coletar a raiz do pequi?
a. () Sim b. () Não Qual:

7. Qual parte da raiz de pequi é utilizada no preparado? a. () A raiz toda

b. () Somente o meio da raiz c. () apenas a casca superficial da raiz

8. Como é preparada a raiz do pequi para o consumo?

a. () Infusão b. () Decocção c. () Macerado 1. () Água 2. () Leite 3. () Álcool 4. () Outros chás

- 10.** Qual a quantidade de raiz é utilizada neste preparado?
- 11.** Onde e como é armazenado o preparado de raiz de pequi? Como: a. () fresco b. () Onde: a. () No armário b. () Na geladeira c. () No congelador d. () Ao ar livre
- 12.** Quanto tempo mantem o preparado armazenado para consumo?
- 13.** Quanto tempo dura o tratamento?
- 14.** Quantas vezes por dia é consumido o preparado de raiz de pequi?
- 15.** Qual é o melhor horário para ingerir a raiz do pequi?
- 16.** Você notou algum efeito indesejado ao utilizar a raiz do pequi? a. () Sim b. () Não Se sim, quais?
- 17.** Há contra indicações ao utilizar a raiz do pequi? a. () Sim b. () Não Se sim, quais?
- 18.** Há quanto tempo já utiliza esta planta medicinal?
- 19.** Além da raiz, você utiliza outra parte da árvore de pequi, para quê?
- 20.** Qual a importância que você dá para a utilização de plantas medicinais como tratam de doenças?

C. Diagnóstico da doença

1. Quais sintomas você pretende tratar ao utilizar raiz de pequi?

- a. () Dor () cabeça () juntas () coluna () ossos () cansaço () lombar
- b. () Febre () calor no corpo () queimação () frio no corpo () vermelhidão () edema
- c. () Fraqueza () nos membros I/S () pés/mãos () cabeça () costas
- d. () Inchaço () nos membros () no estomago () pés e mãos
- e. () Rigidez
- f. () Machucados

Outros:_____

2. Você já procurou o médico antes para tratar estes sintomas? a. () Sim b. () Não

3. Você já utilizou algum medicamento que o médico prescreveu anteriormente? A Sim b. () Não Se Sim, Qual?

4. Você sabe como e quando começou estes sintomas?

5. Você sente dor? Se sim, esta dor é: a. () aguda b. () intensa c. () tipo ardor

8.3. Autorização SISBio



Ministério do Meio Ambiente - MMA
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico

Número: 55367-2	Data da Emissão: 15/08/2016 16:53
Dados do titular	
Nome: Ellen Pereira da Silva Maciel	CPF: 030.942.091-14

SISBIO

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas à autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	A autorização não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador quando as atividades forem realizadas em área de domínio privado ou dentro dos limites da unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; V) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VI) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos..
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/cgen .
8	Esse documento não eximirá o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; II) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; III) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras; IV) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; V) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, dentre outra

Táxons autorizados

#	Nível taxonômico	Táxon(s)
1	FAMILIA	Caryocaraceae
2	REINO	Plantae

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 43412953



Página 1/1

7.4. Certificado do comitê de ética de animais (CEUA)



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação anit-inflamatória e anti-hiperalgésica das raízes de *Caryocar brasiliense Cambess*", registrada com o nº 842/2017, sob a responsabilidade de **Carlos Alexandre Carollo** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 5ª reunião ordinária do dia 19/06/2017.

FINALIDADE	<input type="checkbox"/> Ensino	<input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/04/2017 a 1º/03/2018	
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss	
Nº de animais	119	
Peso/Idade	18 - 25g	
Sexo	Macho	
Origem	Biotério Central/CCBS/UFMS	

Joice Stein
Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 20 de junho de 2017.