



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS
GENÉTICOS VEGETAIS**



TERESA CRISTINA SOUZA REBOUÇAS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DO PÓLEN DE *Corymbia
torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.
(MYRTACEAE).**

TERESA CRISTINA SOUZA REBOUÇAS

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO
EXTRATO BRUTO ETANÓLICO DO PÓLEN DE *Corymbia
torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson.
(MYRTACEAE).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos Vegetais, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Recursos Genéticos Vegetais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angélica Maria Lucchese.
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a Marilene Lopes da Rocha

Feira de Santana - BA
2017

Ficha Catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteado

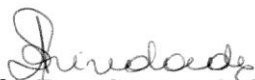
R242c Rebouças, Teresa Cristina Souza
 Composição química e atividade biológica do extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Myrtaceae) / Teresa Cristina Souza Rebouças. - 2017.
 81 f.: il.

 Orientadora: Angélica Maria Lucchese.
 Coorientadora: Marilene Lopes da Rocha.
 Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Programa de Pós-Graduação em Recursos Genéticos, 2017.

 1. *Corymbia torelliana* - Composição química. 2. *Corymbia torelliana* - Uso terapêutico. I. Lucchese, Angélica Maria, orient. II. Rocha, Marilene Lopes da, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.883

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Soraya Castro Trindade
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Prof. Dr. Franco Arsati
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)



Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese
(Universidade Estadual de Feira de Santana - UEFS)
Orientadora e Presidente da Banca

AGRADECIMENTOS

Como agradecer e como não agradecer a tantos.

Jamais poderia alçar voos, completar jornadas, seguir em frente, ou mesmo dar um único passo, sem o apoio constante dos outros seres existentes em minha vida. Somos seres sociáveis e como tal necessitamos um do outro sempre. Como viver só, como alimentar a ilusão de que temos esse terrível poder? Não, nunca, jamais só, eternamente acompanhada pelo bem e por todos que se fazem presentes em minha vida.

Primeiramente agradeço imensamente a Deus pelo Dom da vida, pela proteção constante, pela família, pelos inúmeros e valiosos amigos que a vida reafirma sempre, pelo meu companheiro, pela permissão de vencer mais essa batalha.

Agradeço aos meus pais Teresinha Souza (*in memoriam*) e Carlos Raimundo Rebouças (*in memoriam*), pelo constante incentivo ao crescimento cultural, social e principalmente humano. Nunca terei como expressar minha gratidão pelo tanto herdado de vocês, principalmente os valores (meus amores incondicionais e eternos).

Agradeço à minha família de sangue, pois “família” posso chamar inúmeras pessoas que conquistei e me conquistaram no percurso que fiz durante toda minha vida. Minhas irmãs (Iris, Roberta, Angélica), meus irmãos (Veloso, Bel, Rito), minhas sobrinhas/filhas (Taiara e Uiara e todos os outros sobrinhos), ao meu cunhado/irmão Balbino, aos primos em especial Sônia, enfim a todos da família que sempre foram meu alicerce, amo vocês.

Agradeço a Ivan, meu amigo, companheiro, parceiro e marido, você é muito importante para mim e fez toda diferença nesse momento, sempre me ajudando, mimando, acolhendo, acalmando, incentivando, enfim, obrigada por tudo meu amor.

E os amigos? Contrariando o que dizem, posso sim contá-los em mais de uma das mãos, talvez mãos faltem para isso. Quanto orgulho.

Posso começar agradecendo aos amigos e colegas de trabalho pela compreensão, não foi nada fácil essa etapa de estudo e trabalho, mas consegui. Obrigada SENHOR.

Agradecer as amigas/irmãs de quase uma vida inteira, (Frida, Zenaide, Gilma, Solange, Késsia, que mesmo distante se fazem presentes sempre, obrigada).

Aos amigos mais recentes, porém não menos importantes (meu grupo de jovens: Fábio, Paulinha, Carol, Rodolfo, Lala, Priscila, Loise, Amanda, Alan, Naza, obrigada por todo apoio e companheirismo nos bons e maus momentos, vocês fizeram e fazem uma grande diferença em minha vida).

Aos amigos do prédio (Del, Juliana, Lilian, Danilo, Caio, Fabiana), em especial a Sammya sempre presente e disposta ajudar, eu que o diga e as matérias, e os trabalhos, e os teste de laboratório... Enfim, obrigada amiga por toda ajuda prestada, seria impossível concluir essa etapa sem sua colaboração.

Aos amigos que fiz no decorrer dessa jornada, tanto nas matérias cursadas como nos laboratórios muitas vezes ajudando nos testes realizados, agradeço a todos, e em especial Aline, Horácio, Amanda, Larissa, Daiane, Lucas, que me ajudaram sempre nessa jornada e que contribuíram muito para que os meus resultados estivessem aqui.

Ao pessoal do Biotério, Junior, Keila, Jorge, Allana, John, Débora que foram anjos presentes naquele biotério, ajudando a observar e realizar os testes, muito obrigada por tanta ajuda.

Agradeço imensamente a meus ex-orientadores e amigos constantes por terem contribuído tanto e estarem sempre na torcida pela minha vitória e crescimento (Obrigada Luciene Lima, Luis Figueroa e Francisco de Assis)

Agradeço a todos dos laboratórios LAFAR, LAPRON e BIOTÉRIO, onde desenvolvi boa parte dos meus trabalhos e a UEFS pela estrutura e suporte acadêmico.

Obrigada à empresa Copener por toda colaboração e empenho na coleta do pólen: em especial agradeço a Jacyr Mesquita (gerente); Márcia Alves de Souza; Evilásio Oliveira Santana; Jerônimo Barbosa; Manoel Fagundes Tavares, sem a contribuição de vocês seria impossível à realização desse trabalho.

Agradeço às Professoras Angélica Maria Lucchese e Marilene Lopes da Rocha, por terem aceitado me orientar, me possibilitando esse crescimento acadêmico e profissional. Muito obrigada pela orientação, ajuda e colaboração na construção do meu crescimento.

RESUMO

Corymbia torelliana (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Myrtaceae) é uma espécie polinífera, de fácil adaptação, grande resistência e possíveis potencialidades terapêuticas. Considerando que o pólen tem demonstrado potencial medicinal, este estudo teve como objetivo avaliar a composição química e atividade biológica do pólen dessa espécie. A coleta do material foi realizada na empresa Bahia Specialty Cellulose/Copener. A partir do extrato bruto etanólico do pólen (EEP) foi avaliada a composição química (teor de fenólicos, flavonoides totais e triagem fitoquímica) e realizado testes biológicos de atividade antioxidante, método 2,2-Difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), utilizando camundongos analisou-se toxicidade aguda, coordenação motora (*Rota rod*), atividade analgésica (testes das contorções abdominal induzido pelo ácido acético, da formalina e da placa quente) e anti-inflamatória (teste do edema da pata induzido por carragenina). Foi identificada a presença de terpenos, esteroides e compostos fenólicos e o EEP apresentou $116,21 \pm 7,80$ mgEAG/g de compostos fenólicos e $35,81 \pm 8,37$ mgEQ/g de flavonoides. No teste de atividade antioxidante o pólen foi capaz de sequestrar o DPPH com CE_{50} de $60,85 \pm 4,70$ μ g/mL. Quanto à toxicidade aguda não foi observada nenhuma alteração no teste utilizado, bem como não foi verificada alterações da coordenação motora no teste do Rota rod. Foi verificada a presença de atividade analgésica e anti-inflamatória do EEP nas doses utilizadas (75, 150 e 300 mg/kg), sendo que a dose de 75 mg/kg apresentou o melhor resultado. Os resultados obtidos apontam um potencial antioxidante, analgésico e anti-inflamatório para o EEP dessa espécie, além de uma possível atividade periférica e central.

Palavras-chave: *Corymbia*. Compostos fenólicos. Antioxidante. Analgesia. Anti-inflamatório.

**CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE
ETHANOLIC GROSS EXTRACT OF THE *Corymbia torelliana* POLLEN (F. Muell.)
K.D. Hill & L.A.S. Johnson. (MYRTACEAE).**

ABSTRACT

Corymbia torelliana (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson (Myrtaceae) is a pollinated species, easy to adapt, high resistance and therapeutic potential. Considering that pollen has demonstrated medicinal potential, this study aimed to evaluate the chemical composition and biological activity of the pollen of this species. The material was collected at Bahia Specialty Cellulose / Copener. The chemical composition (phenolic content, total flavonoids and phytochemical screening) was evaluated from the raw ethanolic pollen extract (EEP) and the biological tests of antioxidant activity, 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazila (DPPH) (Rota rod), analgesic activity (tests of abdominal contortions induced by acetic acid, formalin and hot plate) and anti-inflammatory (carrageenan-induced paw edema test) were analyzed using mice. The presence of terpenes, steroids and phenolic compounds was identified and the EEP presented 116.21 ± 7.80 mgEAG / g of phenolic compounds and 35.81 ± 8.37 mgEQ / g of flavonoids. In the antioxidant activity test, pollen was able to sequester DPPH with EC₅₀ of 60.85 ± 4.70 µg / mL. As for the acute toxicity, no change was observed in the test used, nor was there any alteration in motor coordination in the Rota rod test. It was verified the presence of analgesic and anti-inflammatory activity of the EEP in the doses used (75, 150 and 300 mg / kg), and the dose of 75 mg / kg presented the best result. The results indicate an antioxidant, analgesic and anti-inflammatory potential for the EEP of this species, besides a possible peripheral and central activity.

Keywords: *Corymbia*. Phenolic compounds. Antioxidant. Analgesia. Anti-inflammatory.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Imagem da planta *Corymbia torelliana*. A-exemplar da espécie *C. torelliana*; B-Detalhe das partes vegetais e florais da planta; C-Inflorescência (botões e flores da *C. torelliana*). 19
- Figura 2:** Estrutura básica dos compostos fenólicos 23
- Figura 3:** Estrutura do esqueleto básico dos flavonoides 24
- Figura 4:** Cascata do ácido araquidônico, mostrando a formação dos mediadores pró-inflamatório, após lesão. 31
- Figura 5:** A- Mapa contendo os 21 municípios pertencentes ao Distrito Florestal Norte da Bahia, com destaque para Inhambupe (cidade da coleta); B- Área referente ao viveiro de pesquisa da Copener onde as espécies se encontram; C- Visão ampla da área de coleta. 32
- Figura 6:** Preparo do extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia torelliana*. A- Amostra de pólen de *C. torelliana* homogeneizada; B- Pesagem do pólen para produção da solução; C- Preparo da solução etanólica do pólen; D- Amostra em banho maria em óleo de silicone a 70 °C; E- Triplicata do extrato etanólico bruto. 34
- Figura 7:** Metodologia adotada na realização das análises de fenólicos e flavonoides totais: A- Solução inicial para o preparo dos testes de fenólicos e flavonoides; B- Solução em banho maria no ultrassom; C- Amostras protegidas da luz e em descanso; D- Espectrofotômetro (aparelho utilizado na leitura das amostras); E- Amostras de fenólicos no início da leitura; F- Amostras de fenólicos no final da leitura; G- Amostras de flavonoide no início da leitura; H- Amostras de flavonoide no final da leitura. 37
- Figura 8:** Metodologia adotada no teste da Cromatografia em Camada Delgada (CCD). A- Solução feita com o extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia torelliana*, B- Ativação da placa de alumínio a ser utilizada no teste, C- Placa de alumínio com gota da solução do extrato *C. torelliana*, D- Cubas cromatográficas de vidro contendo o sistema de eluição (diclorometano1/1 acetona + uma gota de ácido acético), E- Caixa onde as placas são pulverizadas com os reveladores, F- Aparelho para observação das placas em luz UV-365 nm e luz germicida 254 nm. 40
- Figura 9:** Preparação para a realização do teste de DPPH. A- Solução inicial utilizada no teste; B- Solução no ultrassom para dissolução da substância (pólen); C- Amostras

em banho maria durante a leitura das amostras; D- Leitura das amostras no espectrofotômetro; E- Amostras no início da leitura; F- Amostras no final da leitura	41 42
Figura 10: Gaiola de polipropileno utilizada no armazenamento dos animais	44
Figura 11: Aparelho de Rota Rod utilizado no teste da coordenação motora de animais	45
Figura 12: Caixa de polipropileno utilizada para observação de animais durante o teste do ácido acético.	46
Figura 13: Caixa de vidro utilizada na observação dos animais no teste da placa quente.	47
Figura 14: Equipamento hot plate, utilizado no teste da placa quente.	48
Figura 15: Pletismômetro, aparelho utilizado no teste do edema de pata induzido por carragenina.	

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Média e desvio padrão das concentrações do extrato etanólico bruto para teor de fenólicos e flavonoides totais do pólen da espécie *C. torelliana*. 51
- Tabela 2:** Atividade antioxidante do extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia torelliana* avaliada através do CE₅₀, valores expressos em µg/mL. 53
- Tabela 3:** Peso corporal dos camundongos (controle e dose 300 mg/kg do EEP de *Corymbia torelliana* administrado oralmente). 56
- Tabela 4:** Peso dos órgãos dos camundongos fêmeas (controle e dose 300mg/kg após EEP da espécie *C. torelliana*) administrado via oral. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey). 57

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva padrão de ácido gálico para determinação do teor de fenólicos.	35
Gráfico 2: Curva padrão de quercetina para determinação do teor de flavonoides.	37
Gráfico 3: Curva para cálculo de CE_{50} do extrato bruto etanólico do pólen de <i>C. torelliana</i> , amostra 1.	54
Gráfico 4: Curva para cálculo de CE_{50} de extratos etanólico bruto do pólen de <i>C. torelliana</i> , amostra 2.	55
Gráfico 5: Curva para cálculo de CE_{50} de extrato bruto etanólico do pólen de <i>C. torelliana</i> , amostra 3.	55
Gráfico 6: Representação da média do peso dos camundongos nos dias 1, 7 e 14, no teste de toxicidade Aguda. (n= 5 animais; ANOVA).	57
Gráfico 7: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> sobre a coordenação motora dos camundongos no tempo de 60 min. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	59
Gráfico 8: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> sobre a coordenação motora dos camundongos no tempo de 120 min. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	59
Gráfico 9: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	61
Gráfico 10: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> no tempo de lambida das patas dos camundongos na 1ª fase (fase neurogênica) do teste da formalina. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	63
Gráfico 11: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> no tempo de lambida das patas dos camundongos na 2ª fase (fase inflamatória) do teste da formalina. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	64
Gráfico 12: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> sobre o tempo de latência dos camundongos expostos à placa quente. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).	65
Gráfico 13: Efeito do EEP de <i>C. torelliana</i> sobre a inibição dos edemas das patas dos camundongos induzido por carragenina. (n= 5 animais; ANOVA seguido Two- way).	67

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

- ABTS - Ácido 2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico.
- AINE's – Anti-inflamatórios não esteroidais.
- AlCl₃ – Cloreto de Alumínio ou Tricloreto de Alumínio.
- BDZ – Ansiolítico Benzodiazepínico.
- CCD – Cromatografia em Camada Delgada.
- CE₅₀ – Concentração Mínima Necessária para o Antioxidante Reduzir em 50% o DPPH inicial da Reação.
- CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais.
- CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.
- COX1 – Enzima Ciclo-oxigenase 1.
- COX2 – Enzima Ciclo-oxigenase 2.
- DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidroziila.
- EAG/g ou GAE/g –Equivalente Ácido Gálico por grama.
- EEP – Extrato Etanólico do Pólen.
- EQ/g – Equivalente de Quercetina por grama.
- EPM – Erro padrão da média.
- IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor.
- IM – Indometacina.
- KOH – Hidróxido de Potássio.
- NaCl – Cloreto de Sódio.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development.
- PGs – Prostaglandinas.
- pH – Potencial Hidrogeniônico.
- pKa – pH do Ácido.
- PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos.
- SNC – Sistema Nervoso Central.
- SPE – Extração em Fase Sólida.
- SUS – Sistema Único de Saúde.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1	A Família Myrtaceae	17
2.1.1	A Espécie <i>Corymbia torelliana</i> (F. Muell.) K.D. Hill & L. A. S. Johnson	18
2.2	Pólen	19
2.3	Atividade Farmacológica em Plantas	20
2.4	Compostos Químicos Presentes no Pólen	22
2.5	Atividade Biológica	24
2.5.1	Atividade Antioxidante	25
2.6	Atividade Analgésica e Anti-inflamatória	27
2.6.1	Dor	27
2.6.2	Inflamação	29
3	MATERIAL E METODO	32
3.1	Área de Coleta	32
3.1.2	Coleta do Material Polínico	33
3.1.3	Preparo do Extrato Etanólico Bruto	33
3.2	Análises Químicas	34
3.2.1	Preparo da Solução para os Testes Químicas	34
3.2.2	Determinação do Teor de Fenólicos Totais	35
3.2.3	Determinação do Teor de Flavonoides Totais	36
3.2.4	Determinação da Classes de Metabólitos	38
3.2.4.1	Cromatografia em Camada Delgada (CCD)	38
3.3	Ensaio Biológicos	40
3.3.1	Determinação da Atividade Antioxidante	40
3.3.2	Animais Utilizados	41
3.3.3	Teste Toxicológico	43
3.3.4	Teste Para Avaliação da Cordenação Motora (Rota Rod)	43
3.3.5	Teste das Contorções Abdominais Induzida pelo Ácido Acético	44
3.3.6	Teste da Formalina	45
3.3.7	Teste da Placa Quente	46
3.3.8	Teste do Edema de Pata Induzido por Carragenina	47

4	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	49
4.1	Análise Estatística dos Testes químicos	49
4.2	Análise Estatística dos Testes Biológicos	49
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	50
5.1	Composição Química	50
5.2	Atividade biológica	53
5.2.1	Atividade antioxidante	53
5.2.2	Teste de Toxicidade Aguda	55
5.2.3	Teste do Rota Rod	58
5.2.4	Teste do Ácido Acético	60
5.2.5	Teste da formalina	62
5.2.6	Teste da Placa Quente	64
5.2.7	Teste do Edema de Pata Induzido por Carragenina	66
6	CONCLUSÃO	68
	REFERÊNCIAS	69
	ANEXOS A - Protocolo de liberação do CEUA	80

1 INTRODUÇÃO

Há muitos anos vários produtos apícolas têm sido usados na medicina tradicional, assim como em dietas e complemento nutricional, devido às propriedades nutricionais e fisiológicas que beneficiam a saúde humana (PARK et al., 1998; CARPES, 2008). Monsanto (2013), afirma que os mais relevantes produtos apícolas são o mel, o pólen, a geleia real, cera, própolis e o veneno de abelha (apitoxina). Estes produtos há muitos anos têm tido grande destaque e procura, sendo valorizados pelas suas propriedades terapêuticas e nutricionais, assim como tem-se intensificado o seu uso na medicina tradicional, dietas e nutrição suplementar.

O pólen apícola contém nutrientes essenciais, sendo apropriado, considerando a quantidade de substâncias polifenólicas com possível atividade antioxidante existente nesse produto. Além disso, de forma a contrastar aos vários alimentos, o pólen é rico em proteínas, possui reduzido teor em gordura e elevado teor em minerais e vitaminas (CARPES et al., 2008). Neves et al. (2009), consideram o pólen apícola como fonte de substâncias polifenólicas, a exemplo dos flavonoides, que pode possuir ação antioxidante e sequestradora de radicais livres danosos à saúde humana.

Menezes (2005; 2010) menciona uma correlação entre o valor nutritivo do pólen e a variação que esse sofre em função da espécie vegetal a que esse pólen pertence. Informações como essas demonstram a necessidade de ampliar os estudos em espécies pertencentes à família Myrtaceae, a qual vem se destacando em trabalhos, assim como o citado a cima, sendo um dos tipos mais frequentes em amostras de pólen apícola estudados, pressupondo o grande potencial que as espécies desse gênero possuem no que se refere à produção de pólen apícola a ser comercializado (FERREIRA, 2010).

A escolha da espécie estudada levou em consideração a importância econômica, social e ambiental da família a que esse gênero pertence, baseando-se em critérios tais como a relevância deste na qualidade de fonte de recursos tróficos para abelhas. O pólen da espécie *Corymbia torelliana* (basiônimo: *Eucalyptus torelliana* F. Muell.) é bastante utilizado pelas abelhas como fonte de alimentação, sendo crucial em momentos de escassez, onde a subsistência da colmeia depende de espécies vegetais com amplo período de floração. Outro fator é a ampla distribuição geográfica que a espécie *C. torelliana* possui. Mesmo sendo um gênero introduzido, o mesmo conseguiu se adaptar muito bem ao clima do país, possuindo

hoje uma ampla distribuição, sendo encontrado nos mais diversos locais do país, facilitando dessa forma a coleta do material a ser estudado.

Outro fator de grande relevância é o ciclo reprodutivo de longa duração. A espécie estudada *C. torelliana*, tem se demonstrado com ciclo reprodutivo bastante intenso, se destacando por possuir um período de floração praticamente anual, o que amplia, portanto o potencial polínifero dessa espécie, aumentando as chances de obtenção de material suficiente para a realização das análises a serem realizadas no trabalho.

Vale ressaltar que ainda existe escassez na literatura no que se trata do estudo do pólen coletado diretamente das estruturas florais das plantas. A ausência desse tipo de trabalho deixa em aberto conhecimentos científicos acerca das particularidades encontrado na composição das diversas espécies vegetais existentes, o que influencia diretamente no potencial medicinal do pólen dessas espécies. Muitos dos estudos existentes são realizados com pólen apícola, os quais são compostos por polens das mais diversas plantas, o que leva a resultados generalizados, impedindo dessa forma a obtenção de informação específica sobre os componentes das espécies em questão.

Levando-se em consideração os fatores acima citados, principalmente a escassez de estudos desse tipo, é que se torna de vital relevância trabalhos, enfocando as potencialidades alimentar e medicinal dos polens na dieta alimentar humana, assim como no combate de inúmeras doenças. É nesse sentido que a análise da composição química, assim como a atividade biológica, tem se demonstrado grandes aliadas na contribuição de estudos que levem a um melhor conhecimento das propriedades antioxidante, anti-inflamatória e analgésica dos grãos de pólen e da sua atuação na melhora da qualidade de vida da humanidade.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo geral avaliar a composição química e a atividade biológica do extrato bruto etanólico do pólen da espécie *C. torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson. Sendo os objetivos específicos: a) Indicar as classes de metabólitos presentes no extrato bruto do pólen da espécie *C. torelliana*; b) Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides do extrato bruto do pólen da espécie *C. torelliana*; c) Verificar a ação antioxidante do extrato bruto dos grãos de pólen da espécie *C. torelliana*; d) Investigar a atividade biológica (analgésica e anti-inflamatória) do extrato bruto do pólen da espécie *C. torelliana*.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 A Família Myrtaceae

Na família Myrtaceae estão presentes aproximadamente 100 gêneros e 3.500 espécies de arbustos e árvores, estas espalhadas por todo continente, excluindo a Antártica, sendo dominante nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (BARROSO, 1991; MARCHIORI e SOBRAL, 1997; GRESSELER et al., 2006).

A organização tradicional das Myrtaceae as insere em duas subfamílias, Leptospermoideae e Myrtoideae, estando todas as Myrtaceae americanas encaixadas nesta última, com exceção do gênero *Monotípico tepualia* (MARCHIORI e SOBRAL, 1997; GRESSELER et al., 2006)

A importância dessa família encontra-se nas mais diversas áreas, a exemplo de áreas relatadas em trabalhos realizados por Lorenzi et al. (2006) que menciona a relevância econômica (alimentar de formas diversas) de espécies como *Psidium guajava* L. e *Eugenia uniflora* L. Outras espécies dessa família distinguem-se por suas propriedades medicinais, como *Eucalyptus globulus* L., utilizado terapeuticamente para sinusite, gripe, congestão nasal; além disso indicações etnofarmacológicas apontam *Myrciaria dúbia* (Kunth) Mc Vaugh, como excelente fonte de vitamina C (LORENZI; MATOS, 2002). Em tratamentos populares a espécie *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & L. M. Perry é empregada como terapêutica nas infecções dérmicas, diurética, trato gastrintestinal, respiratório além de inflamações, o que tá relacionado com sua capacidade de impedir a ação da COX-1 no decorrer da biossíntese das prostaglandinas (DUNSTAN et al., 1997; MELO et al., 2009).

Seu fruto carnosos trata-se de mais um recurso, sendo este de caráter alimentar para a fauna silvestre, confirmando ainda a relevância ecológica dessa família, sendo a dispersão das sementes uma das formas de manutenção desse grupo (PIZZO, 2003; GRESSLER et al., 2006). Além disso, muitas espécies dessa família são extremamente relevantes na manutenção e sobrevivência de espécies animais como, por exemplo, as abelhas, que se utilizam do pólen das mais variadas espécies dessa família para manutenção da colmeia. Proença & Gibbs, (1994 *apud* Gressler et al, 2006), afirmam a relevância dessa família apícola no Brasil, o que é comprovado pela constante presença desse grupo nos inúmeros trabalhos que caracterizam espécies vegetais de importância para abelhas.

2.1.1 A espécie *Corymbia torelliana* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson

De acordo com Segura (2015), o gênero *Eucalyptus* engloba acima de 700 espécies sendo este predominantemente nativo da Austrália, na classificação botânica estão inseridas na família Myrtaceae,. A partir dos anos 1970, alguns estudos indicaram que o gênero *Eucalyptus* era um agrupamento taxonômico anormal, apresentando duas diferentes estirpes, a primeira englobando os até então subgêneros *Angophoras* e *Corymbia*, e a outra abarcando o subgênero *Eucalyptus*. Nos anos 1990, o gênero *Eucalyptus* foi reorganizado, fazendo com que os *Angophoras* e *Corymbia* fossem criados. O gênero *Corymbia* possui 113 espécies, este possui madeira com grande densidade básica, altos teores de extrativos e carboidratos, além de uma pequena proporção de lignina. Essas espécies possuem importância comercial principalmente para a obtenção de óleos essenciais de suas folhas e utilização de madeira na construção civil, para a produção de carvão vegetal e geração de energia.

A primeira descrição da espécie *Corymbia torelliana* (Figura 1) ocorreu em 1877 por Mueller, sendo nomeada como *Eucalyptus torelliana* (FORESTRY COMPENDIUM, 2014 *apud* SEGURA, 2015). Hill e Johnson (1995) realizaram estudos taxonômicos que conduziram formalmente *Corymbia* a categoria de gênero, sendo a espécie *Eucalyptus torelliana*, reclassificada como *Corymbia torelliana*. Essa espécie possui árvores altas (de 20 a 30 metros), quando adultas possuem troncos com diâmetros de até um metro, seu habitat natural são margens e interiores de florestas. Uma característica é a coloração esverdeada que suas cascas possuem (FORESTRY COMPENDIUM, 2014 *apud* SEGURA, 2015), sua madeira é bem aproveitada na construção civil devido suas características de resistência (LORENZI et al., 2003).

A espécie possui uma boa resistência ao vento, minimizando os danos causados por este, e tem demonstrado resultados significativos com boas possibilidades na hibridação com *Corymbia citriodora*, havendo indícios de maior crescimento e resistência a pragas (REIS et al., 2014).

Assim, espécies incluídas no gênero *Corymbia* como *C. citriodora*, *C. maculata*, *C. torelliana* e alguns de seus híbridos interespecíficos, vêm sendo citados como relevante no que diz respeito à qualidade da madeira e fácil adaptação a condições ambientais adversas (REIS et al., 2014).

Recentemente, existe um vasto número de plantas medicinais incluídas nas mais diversas famílias botânicas com possíveis propriedades terapêuticas, sendo investigadas

através de diversos modelos animais, assim como, seus mecanismos de ação averiguados por meio de ensaios neuroquímicos (SOUSA et al., 2008).

Em relação ao potencial terapêutico dessa espécie, estudos vêm relatando possíveis atividades medicinais a exemplo de estudos biológicos realizados por Adeniyi et al (2006) que evidenciam que o extrato bruto da folha do *Corymbia torelliana* indica uma certa atividade anti-secretora e gastro-protetora.

Segundo Oyedeji et al (1999), na Nigéria, *C. torelliana* têm sido empregado no tratamento de tosse associada à tuberculose, além de outros tipos de infecções do aparelho respiratório. Os óleos essenciais de *C. torelliana* foi descrito com certa atuação antimicrobianas.



Figura 1. Imagem da planta *Corymbia torelliana*. A- exemplar da espécie *C. torelliana*; B- Detalhe das partes vegetais e reprodutiva da planta; C- Inflorescência (botões e flores da *C. torelliana*).

2.2 Pólen

O grão de pólen é uma estrutura microscópica pertencente às fanerógamas que carrega a célula reprodutora masculina desses vegetais, portanto, estão absolutamente relacionados com a reprodução e perpetuação da espécie (GASPARINO; CRUZ-BARROS, 2006). Diversas são as relações conhecidas entre plantas e animais, entre elas a polinização, que pode ser definida como a transmissão de grãos de pólen das anteras para o estigma, podendo ocorrer na mesma flor ou entre flores diferentes (ARAUJO, J. L. O. et al., 2009).

Os grãos de pólen são revertidos por uma parede denominada de esporoderme, essa é formada de duas, às vezes três, camadas principais: a perina (mais externa), a exina (mais resistente) e a intina (mais interna). Quimicamente, a exina é composta pela esporopolenina, uma substância muito resistente, sendo uma das substâncias orgânica mais resistente que existe; enquanto a intina é de natureza celulósica (SANTOS, 2006).

A esporopolenina é encontrada em palinomorfos desde o pré-cambriano, mas é no ordovinciano que passa a ser mais comum. Esta substância é um polímero de carotenoide, um poliéster de vários monômeros dos quais β -caroteno e a zeaxantina são os mais comuns. Sua biossíntese ainda não está definida, mas, ao menos na exina de grãos de pólen, acredita-se que sejam sintetizadas conjuntamente pelo próprio grão e pelas células do tapete que o rodeiam (JUNIPER; JEFFREE, 1983; SANTOS, 2006).

Os grãos de pólen variam muito em forma, tamanho, tipo de abertura, ornamentação, composição química, estando essa variação relacionada com o tipo vegetal ao qual esses pertencem, podendo dessa forma auxiliar na identificação de espécies vegetais, nos compostos químicos encontrados nas diversas espécies, assim como em sua origem geográfica.

A composição e propriedade do pólen trouxe destaque para esse produto, o que incentivou seu uso na suplementação de dietas humanas, na preservação de um organismo saudável e como perspectiva de tratamento em certas enfermidades. Na década de 80 sua produção se iniciou no Brasil de forma singela e atualmente o mercado favorável ao consumo de produtos naturais, vem incentivando e impulsionando essa modalidade de cadeia produtiva apícola (ALVES, 2013).

O principal componente dos pólen é o carboidrato, principalmente os polissacarídeos insólueis, além de amido, frutose, glicose e sacarose. Nesse ainda se encontra proteínas (principalmente enzimas), aminoácidos, sendo a principal nutrição das abelhas. A gordura é formada de variados lipídios, ácidos graxos, esteróis e hidrocarbonetos e diferentes componentes menores (minerais, flavonoides e vitaminas) (BOGDANOV, 2004).

2.3 Atividade Farmacológica em Plantas

No Brasil as plantas medicinais ajudam a integrar uma das maiores biodiversidades existentes no planeta. Esses vegetais são matérias-primas para a produção de fitoterápicos e outras drogas. O auxílio à pesquisa, a ampliação tecnológica e a inovação baseada na biodiversidade brasileira e de acordo com as necessidades epidemiológicas da população,

constitui relevante artifício para a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2009).

É necessário salientar que dentre a grande quantidade de plantas existente no planeta, a maioria destas é ignorada sob o ponto de vista científico. Entre 250-500 mil espécies, apenas cerca de 5% têm sido examinados fitoquimicamente e um número ainda menor é analisado sob os aspectos biológicos (FILHOS; YUNES, 1998).

Há milhares de anos populações de diversos países usam produtos naturais com a finalidade de curar várias doenças. Esses eram usados pela população de forma a suplementar as drogas artificiais. É de grande relevância o papel das plantas medicinais na saúde do planeta. Mesmo com todo progresso na medicina atual, esses vegetais continuam sendo usados até hoje, contribuindo com a produção de aproximadamente 27% dos medicamentos considerados como agentes terapêuticos (CALIXTO, 2005).

Visando essa relevância, ocorreram alterações que acrescentaram alternativas terapêuticas aos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS), que assegura o alcance às plantas medicinais e fitoterápicos de forma segura, eficiente e com qualidade, nos desiguais níveis de dificuldade do sistema, com destaque para a atenção básica, através de atos preventivos de enfermidades, que visem proporcionar o restabelecimento da saúde além de estratégia, que vise à melhoria da atenção à saúde da população e à inserção social. A política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política Nacional de Práticas Interativas e Complementares no SUS, aprovada por meio da Portaria nº 971, de 03 de maio de 2006 e da Portaria nº 1600, de 17 de julho de 2006, que cria diretrizes, estratégias e responsabilidades para inserção das Plantas Medicinais/Fitoterapia, Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa/Acupuntura, Termalismo Social/Crenoterapia e Medicina Antroposófica, como alternativas de terapia no sistema público de saúde são estratégias de grande relevância para o SUS (BRASIL, 2009).

Além disso, pesquisas químicas e farmacológicas com plantas medicinais para a aquisição de novos componentes com características terapêuticas têm progredido nos últimos tempos. O que é reiterado pelo acréscimo em publicações nacionais e internacionais nessa área, além de terem despontado recentes periódicos específicos acerca de produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, etc (FILHOS; YUNES, 1998).

Esses avanços dependem em grande parte da análise e conhecimento dos componentes existentes na maioria das espécies analisadas, o que permite sugerir o potencial de determinadas espécies, através da diversidade encontrada em seus constituintes, assim como

do mecanismo de ação envolvido. Entre os componentes que apresentam grande relevância estão compostos químicos associados a vários mecanismos orgânicos como defesa e suporte estrutural.

2.4 Compostos Químicos Presentes no Pólen

Os componentes químicos que compõem o pólen sofrem modificação a depender da origem floral, estado de nutrição, clima, idade, geografia, condições ambientais do vegetal, assim como o período do ano. O pólen coletado por abelhas possui elementos nutricionais como vitaminas, aminoácidos, carboidratos, lipídios, proteínas, macro e microelementos minerais. Ademais, o pólen também possui quantidades relevantes de componentes polifenólicos, especialmente da classe dos flavonoides (ANDRADE et al., 1999).

Essas substâncias (polifenólicos) integram a classe dos metabólitos secundários, os quais incluem diversas outras substâncias associadas diretamente ao sistema de defesa das plantas assim como as estratégias por elas utilizadas. Segundo Naczki; Shahidi (2004), os compostos fenólicos são produzidos em condições adversas, onde circunstâncias externas como infecções, ferimentos, radiações UV, ataque de predadores, entre outras situações, ativam o mecanismo de produção dessas substâncias, estando estas também envolvidas no crescimento e reprodução da planta.

Os grupos dos terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, formam a diversidade encontrada nos metabólitos secundários.

Os compostos fenólicos encontram-se entre os metabólitos secundários que apresentam substâncias com capacidade de inibir parte do processo oxidativo, ao qual a célula é submetida constantemente, sendo, portanto, considerados bons antioxidantes naturais.

Existem duas classes de antioxidantes, os que possuem atividade enzimática (estes são compostos com habilidade de impedir a iniciação da oxidação, isto é, enzimas que retiram espécies que reagem com o oxigênio); e os sem essa atividade enzimática (nessas, moléculas relacionam-se com espécies radicalares sendo gastas no decorrer da reação). Nesta categoria, estão inseridos os antioxidantes naturais e sintéticos a exemplo dos compostos fenólicos (MOREIRA; FILHO, 2004).

Pelo ponto de vista químico as substâncias fenólicas (figura 2), podem ser descritos como compostos que contêm anel aromático, possuindo um ou mais componentes hidroxílicos, podendo vir a serem inseridos seus grupos funcionais (LEE et al, 2005).

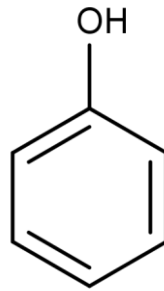


Figura 2: Representação estrutural básica dos compostos fenólicos.

As funções dos compostos fenólicos são diversas dentre os vegetais, o que se atribui a variedade química que esses possuem. Alguns atuam como compostos de defesa combatendo patógenos e herbívoros; outros funcionam dando suporte mecânico; alguns atraem ainda polinizadores ou dispersores de frutos; defesa contra radiação ultravioleta ou restringindo o crescimento de plantas concorrentes próximas (TAIZ; ZEIGER, 2011). Ajudando a compor essa variedade estão os flavonoides que são uns dos compostos fenólicos mais pesquisados.

Os flavonoides são compostos grandemente difundidos no reino vegetal, estando presentes em várias partes da planta, como: sementes, frutas, folhas, e demais partes, encontrando-se na conformação de glicosídeos ou agliconas. Sua fórmula é composta por 15 átomos de carbonos organizados na conformação $C_6-C_3-C_6$ e possui baixo peso molecular (ANGELO; JORGE, 2007).

Representa a maior classe de fenólicos vegetais; nas plantas os diversos tipos de flavonoides exercem atividades distintas como defesa e pigmentação. Os carbonos nesse grupo formam um esqueleto (figura 3) com 15 carbonos estruturados em dois anéis aromáticos, unidos por uma cadeia de três carbonos. São dois os tipos de rotas biossintéticas distintas (rota do ácido chiquímico e a rota do ácido malônico) que resultam na estrutura básica dos flavonoides (TAIZ; ZEIGER, 2011).

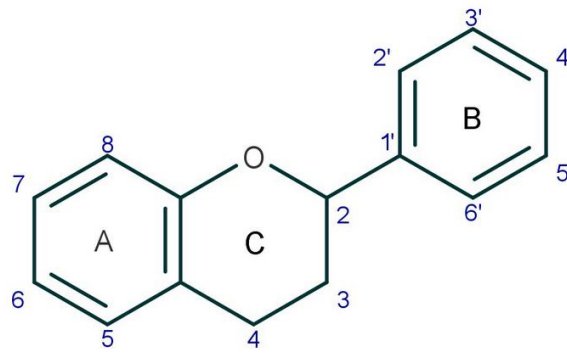


Figura 3: Representação estrutural do esqueleto básico dos flavonoides.

2.5 Atividade Biológica

Segundo Vilas-Boas, et al. (2004); Carnevalli e Araujo (2013), pode-se relacionar a atuação biológica dos componentes naturais a habilidade desses em serem metabolizados pelo organismo, através da ligação destes componentes a seus receptores exclusivos, estimulando uma reação orgânica, ou seja uma resposta biológica. Características como dose ingerida, diferenças na sensibilidade orgânica dos seres e perfil farmacocinético dos constituintes, é que levam a essa resposta biológica.

A natureza dispõe de várias plantas que possuem substâncias capazes de atuar como drogas com os mais diversos efeitos, sendo muitas vezes a atividade biológica desenvolvida por essas de atuação direcionada ao sistema nervoso central, periférico ou ambos.

Mesmo obtendo várias definições, “droga” segundo Almeida R. N. (2006), é regularmente a expressão utilizada para indicar os diversos agentes químicos que modificam o sistema biológico nos seres vivos, a exemplo dos medicamentos “psicotrópicos” os quais são capazes de mudar o desempenho do sistema nervoso central, levando a transformar processos mentais e comportamentais.

Já no que diz respeito ao termo “fármaco”, este é o constituinte químico que é o princípio ativo do medicamento, ou seja, o componente indispensável à produção de um medicamento, sendo este encarregado pela eficácia curativa do mesmo (BRASIL, 2009).

A atividade biológica de diversas plantas por muitos anos continuaram ignoradas mesmo havendo estudos que isolassem, detectassem e publicassem os componentes vegetais de muitas espécies. Estudos envolvendo a atividade biológica de extratos de plantas permitem

ampliar o conhecimento sobre os grupos botânicos, colaborando para a inclusão destas na terapêutica (LAHLOU, 2004).

Muitas das atividades biológicas de drogas e fármacos são observadas através de estudos com modelos animais, os quais permitem elucidar a contribuição e eficácia das plantas nos processos curativos.

Segundo Morales (2008), para o entendimento de fatos biológicos é fundamental o uso de modelos animais, assim como, métodos distintos, vindo a gerar benefícios para a saúde humana assim como para outros animais.

Conhecimentos e técnicas atuais como modelos animais utilizados em testes biológicos, técnicas bioquímicas e ampliação do conhecimento da relação droga-receptor, vieram contribuir com entendimentos da psicofarmacologia já construída. Terapias farmacológicas tornaram-se mais eficazes através desses novos aprendizados e técnicas adquiridas (ALMEIDA, R. N., 2006).

Por esse motivo, procedimentos de averiguação onde são sondadas a contar da elaboração do produto até a inscrição de uma patente, seguindo-se a sua venda, têm como procedimento requisitar sempre pesquisas, nas quais modelos animais são constantemente empregados (ECOBICHON, 1997; CAZARIN, 2004). Essa prática cada vez mais comum vem colaborando para ajudar na elucidação de novos conhecimentos relativos à potencialidade de várias substâncias ainda ignoradas pelo mundo científico.

2.5.1 Atividade Antioxidante

Os compostos químicos que têm propriedades preventivas ou capacidade de minimizar danos oxidativos de várias substâncias como as proteínas, lipídios, ácidos nucleicos provocados por espécies de oxigênio reativo, são denominados de antioxidantes. Espécies como essas são produzidas no organismo e são responsáveis por vários danos celulares que geram diversas anomalias fisiológicas e doenças, assim como câncer, inflamação, envelhecimento precoce e doenças cardiovasculares (FREIRE et al., 2013).

Entre os métodos utilizados para avaliar a atuação dos antioxidantes encontra-se a técnica de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O DPPH é um radical livre com tempo de vida longa, boa estabilidade molecular e pequena reatividade. Por se unir a qualquer radical livre acessível, esse se torna um método bastante abrangente. Segundo Brand-Williams et al. (1995) e Rufino (2007), antioxidantes capazes de aprisionar o radical

DPPH são a base desse método, gerando uma diminuição da absorbância a 515 nm. Em 1998 Sánchez-Moreno e colaboradores modificaram o método com o objetivo de medir os parâmetros cinéticos.

Para adquiri-lo, é necessário fazer uma solução onde se dissolve o reagente diretamente em meio orgânico (RUFINO et al., 2007). Os radicais DPPH no começo do processo exibem uma coloração arroxeadada, o que está associado ao fato de possuírem um elétron livre. Essa cor é modificada quando uma molécula antioxidante doa um radical de hidrogênio que entra em contato com a molécula de DPPH (MENEZES et al., 2010).

Esse método apresenta vantagens e desvantagens quando comparado a outros utilizados. Segundo Lima, A. (2008) essa técnica é vantajosa quando se considera a fácil aquisição do produto, além dos radicais envolvidos serem estáveis, impedindo que este seja produzido de formas diferentes a exemplo do método ABTS, o que simplifica sua utilização.

A desvantagem é que por ser um radical estável e de baixa reatividade, esse não consegue simular muito bem o que acontece no sistema biológico, portanto o que se observa geralmente é que os extratos nem sempre demonstram a mesma equivalência quando utilizado no sistema biológico. Esse fator faz com que o método DPPH seja utilizado geralmente associado a outros métodos antioxidantes, aumentando dessa forma a precisão dos resultados.

Segundo Daglia et al. (2000) e Menezes (2009), o pólen apícola possui atividade antioxidante capaz de impedir a atuação de radicais livres. Estes são fabricados pelo organismo sadio constantemente, porém sua produção é ampliada no desenvolvimento de doenças cardiovasculares, cânceres variados, doenças neurodegenerativas, a exemplo de Parkinson e Alzheimer, cirrose hepática, diabetes mellitus, dentre outros.

Atualmente, o pólen apícola tem se destacado entre estudiosos de todo planeta devido às propriedades antioxidantes existentes nesse produto, tendo destaque especial para as propriedades biológicas, a exemplo de atuações antifúngica, imunodulatória, antibacteriana, anti-inflamatória, anticarcinogênica (MENEZES, 2009; NEVES et al., 2009).

O pólen possui componentes nutritivos que intensificam a atuação das reações celulares, a biossíntese de substâncias imprescindíveis no funcionamento glandular, anula formação dos radicais, fortalecer o sistema imune, minimizar a possibilidade de desenvolver câncer, doenças cardiovasculares, enfim, sendo esse alimento bastante relevante na manutenção da saúde (CASTAGNINO 2002; MENEZES, 2009).

2.6 Atividade Analgésica e Anti-inflamatória.

A palavra analgesia na compreensão do vocábulo significa inexistência de dor. O ser humano consegue descrever sensações percebidas que permitam uma melhor avaliação da dor e analgesia, já em animais essa análise se dá indiretamente através de aspectos fisiológicos e comportamentais (RIVERA, 2002).

Já em relação à atividade anti-inflamatória, pode-se referir a qualquer atividade desempenhada por agentes externos a exemplo dos medicamentos anti-inflamatórios, que combatam alguns processos inflamatórios gerados pelo organismo.

2.6.1 Dor

Ao longo do desenvolvimento progressivo (aperfeiçoamento) obtido pela humanidade a dor é caracterizada como um evento universal, vivenciado de certa maneira em algum período da vida. O termo dor provém do latim da palavra “poena” tendo como designação “a sensação a qual a pessoa experiencia desconforto, aflição, ou sofrimento devido a impulsos de nervos sensitivos” (FREE, 2002; SABINO, 2015).

Segundo Paiva (2013) a dor é um mecanismo de defesa, que aciona processos fisiológicos fundamentais. Ela permite que o indivíduo tome conhecimento de alterações em seu organismo que podem colocar em risco sua integridade.

Porém uma definição bastante aceita até os dias atuais foi cunhada pela IASP (1979), a qual define dor como “uma experiência tanto de cunho sensorial e emocional desagradável que está relacionada a lesões reais ou potenciais de tecidos ou descrita em termos de tal dano” (IASP, 2010).

Segundo Leão et al. (2013) a ocorrência da dor segue a história da raça humana assim como da medicina. A inquietação na tentativa de entender os eventos dolorosos, assim como a investigação de recursos para cuidar e conter de forma eficaz desses eventos, é evidenciada em descrições muito antigas.

Com o decorrer dos anos e com o surgimento da *International Association for the Study of Pain* (IASP) a partir dos anos 1970, teorias foram sendo sugeridas e os estudos sobre dor obtiveram um maior ânimo. Estudos científicos vêm destacando mecanismos dolorosos tais quais, os variados tratamentos, assim como em todo mundo dados de estudos são

publicados, aumentando significativamente a geração de conhecimento nessa área (ROBERT, et al., 2010; LEÃO et al., 2013).

Alguns estudos analisaram as proporções da dor, a qual varia conforme o tipo de dor (aguda, recorrente ou mesmo crônica), as circunstâncias da dor (técnicas ou exames invasivos dolorosos, cirurgia ou aspecto clínico), bem como as características da dor (local, intensidade, duração e qualidade efetiva) (LINHARES; DOCAS, 2010; SABINO, 2015).

Segundo Teixeira (2001), a dor possui como causa o descontrole demasiado de estímulos nociceptivos, ou mesmo, o acréscimo na atividade do sistema supressor de dor, a exemplo, da dor provocada por desafferentação (dor neuropática).

Em condições naturais, a mensagem sensorial é percebida e assimilada pelas estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e propagada para as unidades do Sistema Nervoso Central (SNC), onde é decodificada e traduzida. Os mecanismos modulatórios impulsionam ou suprimem a nocicepção em todos os estágios em que ela ocorre (TEIXEIRA, 2001).

A etapa inicial na sequência dos eventos que inicia o fenômeno sensitivo-doloroso é a modificação dos estímulos ambientais físicos ou químico intensos, em potencial de ação, os quais eram transmitidos ao SNC a partir das fibras nervosas periféricas. As fibras mielínicas finas A-d e amielínicas possuem terminações nervosas livres que representam os receptores nociceptivos. A sua classificação está associada aos tipos de estímulos que os acionam, sendo estes descritos como, termomecânicos, químicos e polimodais inespecíficos (TEIXEIRA, 1990).

A dor (nocicepção) também pode ser induzida de forma indireta, a partir de alguns tipos de ensaio, a exemplo do teste do ácido acético. Nesse há influência de mediadores endógenos, a exemplo da bradicinina, serotonina, histamina, substância P e prostaglandinas. Estes mediadores incitam os neurônios nociceptivos periféricos vulneráveis a analgésicos narcóticos e anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) (COLLIER et al., 1968; CECÍLIA e MURGAS, 2014). Nesse caso o mecanismo de nocicepção pode ocorrer ainda através da dissociação de prótons presentes no ácido acético, que estimulam os canais Receptor Vanilóide de Potencial Transitório tipo 1 (TRPV1) e Canais Iônicos Sensíveis a Ácido (ASICs), sensíveis ao pH, e que ficam localizados nos neurônios aferentes primários (LEFFLER et al., 2006).

A analgesia provocada pelos agonistas do receptor TRPV1 ocorre por diversos procedimentos como dessensibilização, distúrbio no nociceptor, devastação dos terminais

simpáticos que traduzem os TRPV1 e desgaste de neuropeptídeos (SCHUMACHER et al., 2010).

O TRPV1 faz parte da superfamília dos TRPs e estão implicados em varias doenças já descritas, porém, predomina hoje em dia como foco de pesquisa nos distúrbios dolorosos (SCHUMACHER, 2010).

Já os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), são codificados por 4 genes, gerando subunidades denominadas de ASICs1 até ASIC4, sendo ainda encontradas muitas variações do ASIC. Esses canais são trímeros de proteínas, podendo sua constituição variar em distintas combinações de subunidades (FEIN, 2011; DIAS, 2012).

2.6.2 Inflamação

A palavra inflamação expressa um complicado fenômeno orgânico diante de uma manifestação infecciosa, por meio de antígeno ou lesão celular ou tecidual, com características benéficas, buscando eliminar o agente invasor e danoso para estimular a reparação tecidual (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004; PIORNEDO, 2010).

Muitos são os mecanismos que acionam o *feedback* de defesa do organismo, entre essas respostas está a inflamação que ocorre após danos celulares provocados pelos mais diversos fatores a exemplo de agentes químicos (substâncias cáusticas, toxinas), físicos (queimaduras, trauma, radiação), micróbios, necrose tecidual e/ou reações imunológicas (ABBAS; JANEWA, 2000; LIMA, R. R. et al., 2007).

O processo inflamatório (resposta de defesa) traz inúmeras vantagens ao organismo; este mecanismo restringe a sobrevivência e multiplicação dos organismos causadores de doenças, além de estimular a sobrevivência do tecido através da melhora e restabelecimento do mesmo, além de preservar a energia do organismo. Contudo, uma inflamação abrangente, prolongada, não controlada, causa danos bastante relevantes ao organismo. O controle dos processos pró-inflamatórios ocorre por uma sequência similar de processos anti-inflamatórios teciduais (ABBAS; JANEWA, 2000; LIMA, R. R. et al., 2007).

Segundo Nunes (2012) são os mediadores químicos da inflamação (constituintes endógenos disponibilizados pelo organismo após uma incitação de alguma lesão) que possibilitam o surgimento de manifestações semelhantes que definem a resposta inflamatória.

Esses mediadores disponibilizados agem no local da inflamação favorecendo o surgimento das manifestações cardinais peculiares desse processo (dor, calor, rubor e tumor),

podendo estes sintomas estar associados ou não a ausência da função do tecido ou órgão afetado (ROCHA e SILVA, 1994; LEITE, 2012).

Células que se deslocam assim como tecidos lesionados viabiliza o surgimento de mediadores químicos que são disponibilizados desencadeando o processo inflamatório. Muitos são os mediadores, porém entre os imprescindíveis estão à histamina, as proteases plasmáticas, os metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), o aspecto ativador de plaquetas, as interleucinas, o óxido nítrico, os constituintes lisossômicos dos leucócitos e as espécies reativas de oxigênio sendo esses os principais (CALIXTO et al., 2000; BERNARDI, 2009).

Já Serhan; Oliw (2001), apontam entre os mediadores dos processos inflamatórios, os eicosanoides. Após danos sofridos pela membrana essas moléculas são produzidas através do ácido araquidônico, os quais são liberados por fosfolipídios de membranas celulares, através da atuação da enzima fosfolipase A₂. O ácido araquidônico serve de estrutura para a formação de quatro grupos de enzimas: ciclooxigenase, 5-lipoxigenase, 12-lipoxigenase e 15-lipoxigenase. Desta forma diversas reações em cascata originam os mediadores pró-inflamatórios prostaglandinas, tromboxanas e leucotrienos (Figura 4).

Integralmente o processo inflamatório corresponde a três etapas distintas. Fase aguda determinada por acontecimentos vasculares (ocorrência de vasodilatação local e expansão da permeabilidade vascular). Na fase tardia ocorre transmigração das células, com infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a etapa proliferativa crônica, onde acontece a degradação tecidual e fibrose, vindo a ocasionar a dor por intermédio da sensibilização e ativação dos nociceptores (LEES et al., 2004).

Inflamação com período curto e manifestando sinais cardiais (dor, rubor, calor tumor e ausência de funções) caracteriza-se por estar na fase aguda. Porém se a duração tem período indeterminado, diferenciando de acordo com os mediadores celulares e humorais implicadas no processo, já passa a ser a fase crônica. Alterações resultantes da liberação desses mediadores induzem ao intumescimento tecidual por meio do extravasamento de proteínas plasmáticas, com decorrente saída de água para o tecido e a invasão de células inflamatórias, com intenção de anular o agente nocivo (GILMAN et al., 2006; CASTRO, 2011).

A enzima ciclooxigenase responsável por impossibilitar a produção de prostanoídes, é inibida por alguns fármacos anti-inflamatórios. Todavia, esses mediadores além de encarregados em promover a inflamação, atuam com relevância também na modulação de vários acontecimentos fisiológicos a exemplo da secreção ácida gástrica, sendo indispensável no bom andamento do equilíbrio orgânico. Sendo assim, novos constituintes com

potencialidade anti-inflamatória, diminuição de efeitos adversos e com custo reduzido, tem sido pesquisado com o intuito de substituir os vários agentes terapêuticos atuais que apresentam inúmeros efeitos secundários e desagradáveis (CASTRO, 2011).

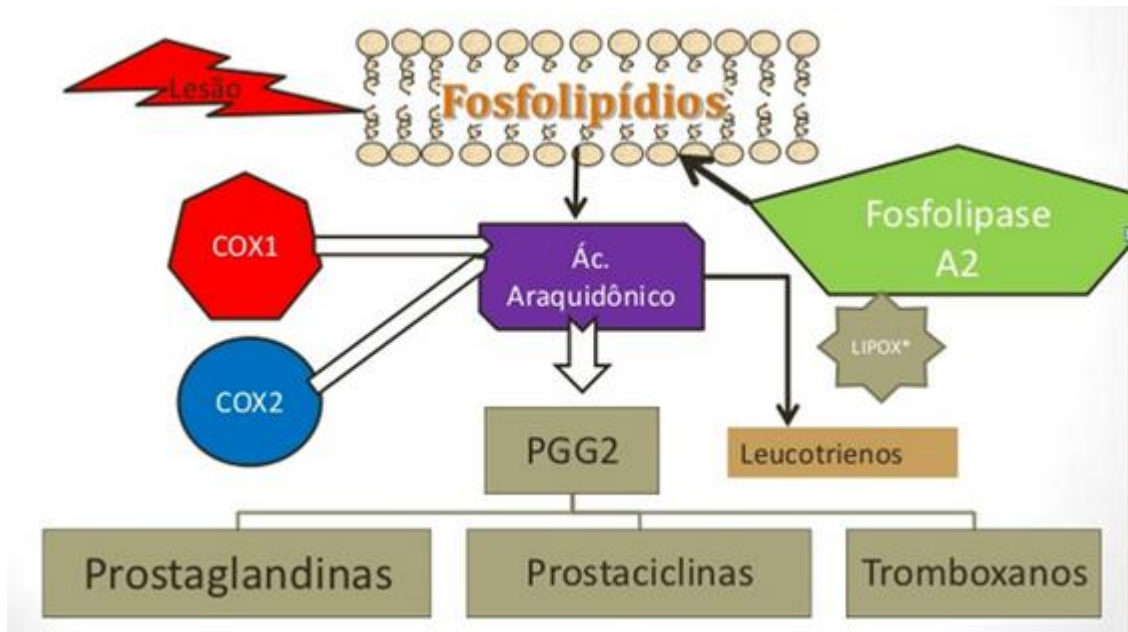


Figura 4: Cascata do ácido araquidônico, mostrando a formação dos mediadores pró-inflamatório, após lesão.

Disponível em: <https://pt.slideshare.net/borajon/inflamacao-e-dor>

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Área de Coleta

O material a ser utilizado na pesquisa foi coletado em uma área de plantio de *Eucalyptus*, pertencente à empresa, Bahia Specialty Cellulose/Copener, na cidade de Inhambupe – BA.

A empresa em questão possui uma unidade industrial situada no complexo de Camaçari, a qual se soma a vários plantios de *Eucalyptus*, distribuídos em 21 municípios do Litoral Norte do Estado, conhecidos como Distrito Florestal Norte da Bahia (figura 5). Esta região está situada entre as latitudes $11^{\circ} 16' 10''$ e $12^{\circ} 36' 17''$ s, e longitudes de $38^{\circ} 59' 15''$ e $37^{\circ} 25' 19''$ W e os municípios compreendidos são: Acajutiba, Água Fria, Alagoinhas, Aporá, Araçás, Aramari, Biringinga, Cardeal da Silva, Catu, Conde, Crisópolis, Entre Rios, Esplanada, Inhambupe, Itanagra, Jandaíra, Mata de São João, Olindina, Ouriçangas, Rio Real e Sátiro Dias.



Figura 5: A- Mapa contendo os 21 municípios pertencentes ao Distrito Florestal Norte da Bahia, com destaque para Inhambupe (cidade da coleta); B- Área referente ao viveiro de pesquisa da Copener onde as espécies se encontram; C- Visão ampla da área de coleta.

Entre essas regiões ocorrem quatro tipos bioclimáticos que se sucedem do litoral em direção ao interior: clima úmido, subúmido úmido, subúmido seco e semiárido. A temperatura média anual está em torno de 25° C, com pequenas oscilações mensais, sendo a média das

máximas de 29° C e a média das mínimas de 20° C. As chuvas concentram-se no período de abril a julho, com ocorrência de um pequeno pico secundário em novembro/dezembro. As precipitações médias anuais variam de 700 a 2000 mm/ano, do interior para o litoral (COPENER, 2014).

3.1.2 Coleta do Material Polínico

A coleta do material polinífero da espécie *C. torelliana*, foi realizada em populações ocorrentes em uma área de plantio de *Eucalyptus* pertencente à empresa, Bahia Specialty Cellulose/Copener, na cidade de Inhambupe - BA.

Foram utilizados alguns exemplares das espécies a serem trabalhadas, sendo coletada a inflorescência destas, para posterior retirada do pólen e análise da composição química e atividade biológica desse material.

Foram realizadas quatro coletas, sendo estas nas seguintes datas: 16/03; 14/04; 03/06; 10/07, seguindo-se o critério de disponibilidade de material (período de floração), totalizando 45.77g de pólen coletado no ano de 2015. As amostras de pólen retiradas dos estames foram limpas manualmente, retirando os excessos, sendo posteriormente armazenadas em locais devidamente resfriados (congelamento).

Foram coletados ramos florais da espécie analisada, para produção das exsiccatas e depósito no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), com o número de registro 225737.

3.1.3 Preparação do Extrato Bruto Etanólico

As amostras de pólen coletadas foram reunidas para preparação do extrato bruto etanólico. O preparo do extrato (figura 6) foi feito com base em Carpes et al. (2007), com adaptações. Foram utilizados 14 g de pólen para 105 ml de etanol a 70%, a 70°C em banho Maria com óleo de silicone, por 30 minutos sobre agitação permanente. Após esse tempo a solução foi filtrada, e colocada na capela de exaustão para evaporação do solvente. Após

alguns dias a mesma foi colocada na estufa para secagem, gerando um extrato bruto final. O procedimento foi realizado em triplicata.



Figura 6: Preparo do extrato bruto etanólico do pólen de *Corymbia torelliana*. A- Amostra de pólen de *C. torelliana* homogenizada; B- Pesagem do pólen para produção da solução; C- Preparo da solução etanólica do pólen; D- Amostra em banho Maria em óleo de silicone a 70°C; E- EEP de *C. torelliana*.

3.2 ANÁLISES QUÍMICAS

3.2.1 Preparo da Solução para os Testes Químicos

A solução inicial foi produzida com a utilização de 0,01 g do EEP da espécie *C. torelliana* dissolvido em 10 ml de etanol a 70%. Seguindo-se, a mesma foi colocada no

ultrassom, para a total dissolução do extrato no solvente. As análises fotoquímicas foram realizadas em triplicata.

A solução inicial foi utilizada nos testes de quantificação de fenólicos totais, flavonoides totais e determinação da atividade antioxidante através do método DHHP.

3.2.2 Determinação do Teor de Fenólicos Totais

O teor de fenólicos totais foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu empregando-se ácido gálico como padrão, segundo Peres et al. (2009) com modificações. Uma alíquota de 100 μL da solução inicial foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, seguido da adição de 1000 μL de água ultrapura e 200 μL do reagente de Folin-Ciocalteu. Após repouso de cinco minutos e protegido da luz, 600 μL de uma solução de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15% foi acrescentada. Após nova homogeneização a solução foi finalizada, completando-se o volume do balão (5ml) com água ultrapura, com agitação em vórtex. Após repouso de noventa minutos em temperatura ambiente e com proteção da luz, as absorbâncias das amostras foram lidas a 750 nm, (figura 6). O resultado foi expresso como mg de EAG (equivalentes em ácido gálico) por g de EEP utilizados no preparo da solução. Os testes foram realizados em triplicata.

O Folin Ciocalteu é um reagente formado por uma solução de íons complexos poliméricos constituídos com base em heteropoliácidos fosfomolibdicos e fosfotungsticos. Esse reagente reduz os ácidos a um complexo azul MO-W, através do processo de oxidação dos fenolatos (NEVES et al., 2009).

A curva abaixo ($R^2 = 0,9993$) foi adotada para calcular o teor de compostos fenólicos dos extratos (Gráfico 1).

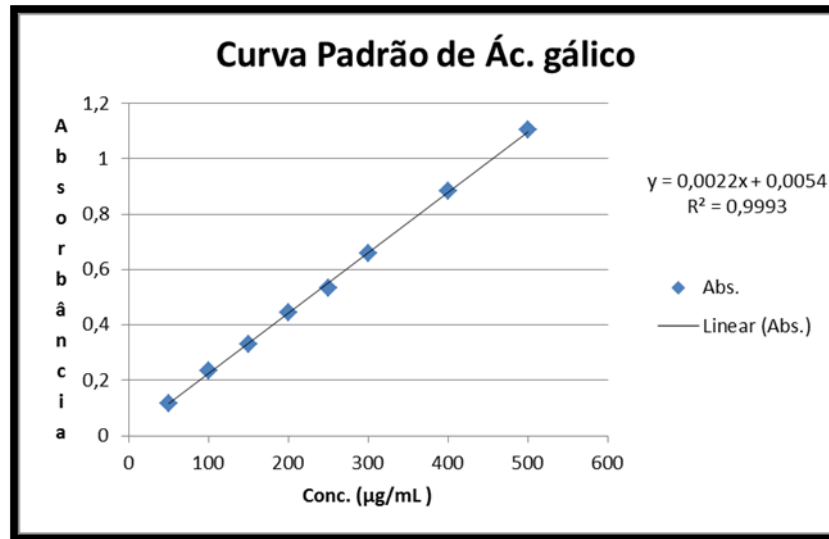


Gráfico 1: Curva padrão de ácido gálico para determinação do teor de fenólicos.

3.2.3 Determinação do Teor de Flavonoides Totais

O teor de flavonoides totais foi determinado utilizando o método do cloreto de alumínio (BANOV et al., 2006; WOISKY, 1996). Uma alíquota de 1,5 mL da solução inicial do EEP foi transferida para um balão volumétrico de 5 mL, seguido da adição de 100 µL de solução metanólica de $AlCl_3$ a 5%, completando-se o volume do balão com solução metanólica de ácido acético a 5%, homogeneizando a solução. Após repouso de 30 minutos protegido da luz, as absorvâncias das amostras foram lidas a 425 nm, (figura 7). O resultado foi expresso como mg de EQ (equivalentes em quercetina) por g de extrato de pólen. Os testes foram realizados em triplicata.

A curva abaixo ($R^2 = 0,9922$) foi adotada para calcular o teor de flavonoides dos extratos (Gráfico 2).

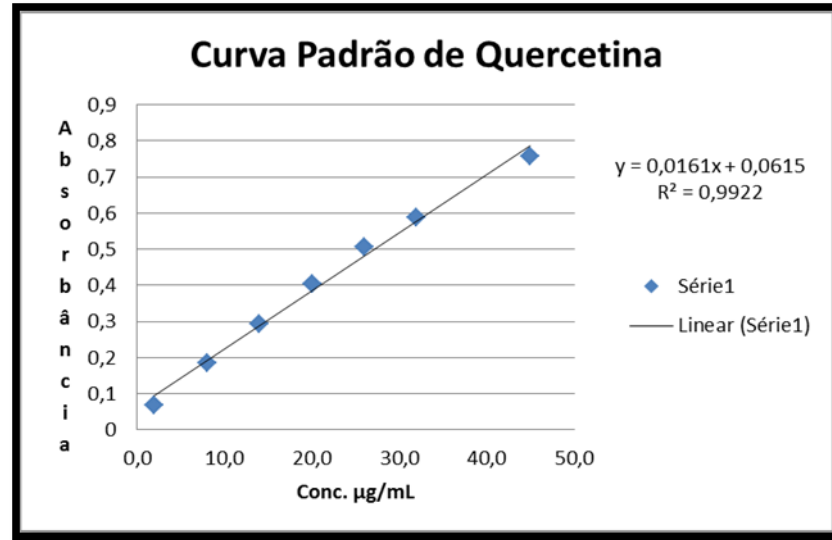


Gráfico 2: Curva padrão de quercetina para determinação do teor de flavonoides

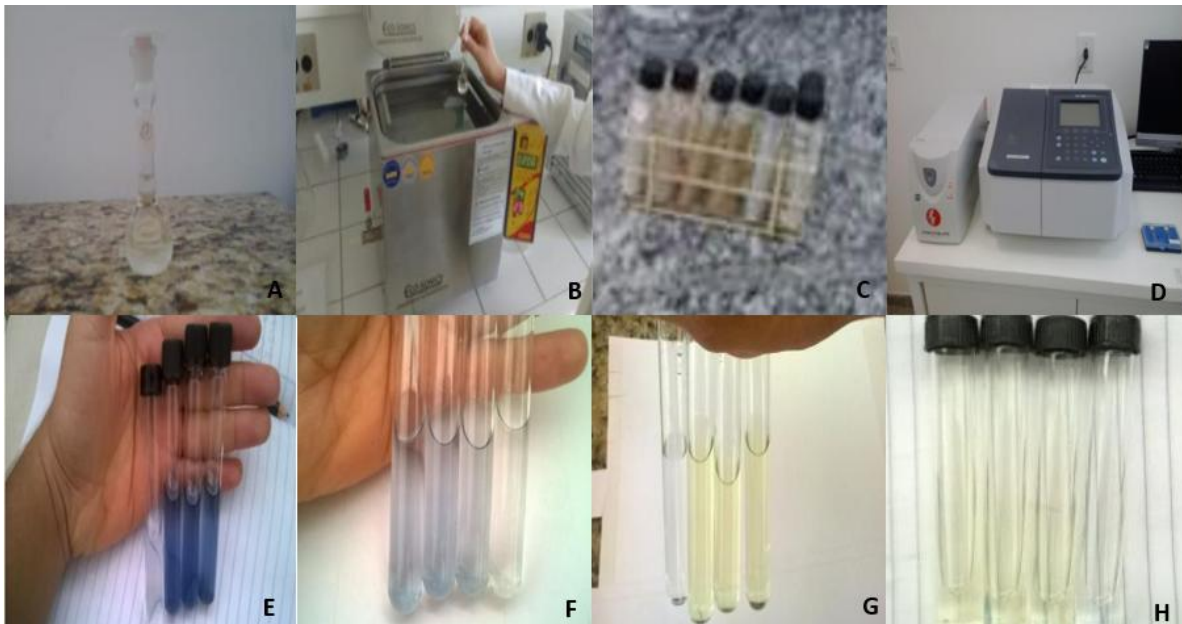


Figura 7: Metodologia adotada na realização das análises de fenólicos e flavonoides totais: A- Solução inicial para o preparo dos testes de fenólicos e flavonoides; B- Solução em banho Maria no ultrassom; C- Amostras protegidas da luz e em descanso; D- Espectrofotômetro (aparelho utilizado na leitura das amostras); E- Amostras de fenólicos no início da leitura; F- Amostras de fenólicos no final da leitura; G- Amostras de flavonoide no início da leitura; H- Amostras de flavonoide no final da leitura.

3.2.4 DETERMINAÇÃO DA CLASSES DE METABÓLITOS

3.2.4.1 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato bruto etanólico do pólen de *C. torelliana* (EEP) foi submetido à avaliação por cromatografia em camada delgada (CCD), sendo revelados com a utilização de reveladores químicos para as seguintes classes de metabólitos: compostos nitrogenados (alcaloides), compostos fenólicos (flavonoides, cumarinas, terpenos), terpenos e esteroides.

Para a realização da cromatografia em camada delgada (CCD), preparou-se inicialmente a solução do extrato (EEP), 0,05g de extrato em 1 mL de etanol, em seguida placas de alumínio do tipo TLC sílica gel 60F 254 nm, foram aquecidas em estufa a 100°C por 40 minutos para ativação da mesma. As soluções iniciais foram colocadas nas placas com a ajuda de capilares, as diversas placas receberam a mesma concentração da solução (EEP), sendo em seguida expostas à eluição em fases móveis pré-selecionadas (figura 8).

Foram realizados ainda testes com sistemas de eluição para detectar o melhor sistema de solvente a ser utilizado (acetona; acetato de etila 50 ml + 6,75 ml de metanol + 5 ml de H₂O destilada; clorofórmio; hexano; diclorometano; metanol; diclorometano 7/3 acetona; acetato de etila; metanol + um pouco de ácido acético; diclorometano1/1 acetona + uma gota de ácido acético), sendo o último sistema de eluição o que demonstrou eficácia e por isso o utilizado no teste. Em seguida, as placas contendo gotas das amostras foram colocadas em cubas cromatográficas de vidro contendo o sistema de eluição (diclorometano1/1 acetona + uma gota de ácido acético). Foram preparadas 6 placas para revelação, sendo que uma das placas serviu como padrão e as cinco restantes contendo amostras (EEP), levando a indicação das classes de compostos existentes no pólen.

Segundo Wagner e Bladt (2001), a identificação das cumarinas nos extratos é realizada usando como revelador o reagente hidróxido de potássio (KOH), em uma concentração de 5 a 10% com etanol (C₂H₆O). Essa classe de metabólitos em solução alcalina se expressa através da coloração amarelada, devido a quebra do anel lactônico e sua observação se dá sob luz ultravioleta (360 nm), tendo na maioria das vezes fluorescência azul-brilhante ou verde (SIMÕES et al., 2007).

Já os flavonoides são revelados, utilizado o reagente polietilenoglicol (NP/ PEG), utilizado em produtos naturais. O preparo desse reagente seguiu a metodologia descrita por Wagner; Bladt (2001), onde o reagente difenilbórico ácido-β-etilamino foi dissolvido em

metanol na concentração de 1% (NP). O polietilenoglicol-400 foi diluído em etanol na concentração de 5% (PEG), sendo essa solução utilizada para pulverizar as placas após a aplicação de NP. Caso existissem flavonoides na amostra analisada esta demonstrariam fluorescência, sendo a mesma observada sob a luz ultravioleta (360 nm).

Em relação à identificação de terpenos e esteroides, Wagner e Bladt (2001), relatam como revelador para essa classe anisaldeído, em combinação com ácido sulfúrico (H_2SO_4). A placa, depois de pulverizada pela mistura já mencionada, foi colocada na estufa a $100^\circ C$ por 5-10 minutos, sendo analisada a olho nu sua coloração logo após a retirada da mesma. A presença de manchas com cores entre vermelho e violeta indica a presença dessa classe de compostos.

Para constatar a existência de triterpenos e esteroides, o reagente empregado foi Libermann- Burchard. Seu preparo é feito utilizando 5 mL de anidrido acético mais 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, sendo esses adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol (WAGNER; BLADT, 2001). A placa foi pulverizada com o revelador mencionado, indo em seguida para a estufa a $100^\circ C$ durante 5-10 minutos. Após sua retirada, a observação é feita em luz UV-365 nm e luz germicida 254 nm, sendo a presença de fluorescência a confirmação da existência destes compostos na amostra.

Por último, foi utilizado o reagente de Dragendorff (iodo-bismutato de potássio), que detecta alcaloides. Essa solução foi preparada dissolvendo-se 0,85g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético e 40 mL de água aquecida; em seguida, uma solução estoque foi preparada dissolvendo-se em outro recipiente 8g de iodeto de potássio em 30 mL de água. Depois de prontas, as soluções foram misturadas em uma proporção de 1:1. Dessa mistura foi retirado 1 mL e misturado a 2 mL de ácido acético e 10 mL de água para a pulverização da placa. A observação da placa acontece a olho nu e o resultado é considerado positivo quando há manchas de coloração marrom (WAGNER; BLADT, 2001).



Figura 8: Metodologia adotada no teste da Cromatografia em Camada delgada (CCD). A- solução feita com o extrato etanólico bruto da espécie *C. torelliana*, B- Ativação da placa de alumínio a ser utilizada no teste, C- Placa de alumínio com gota da solução do extrato *C. torelliana*, D- cubas cromatografica de vidro contendo sistem de eluição (diclorometano1/1 acetona + uma gota de ácido acético), E- Caixa onde as placas são pulverizadas com reveladores, F- aparelho para observação das placas em luz UV-365 nm e luz germicida 254 nm.

3.3 ENSAIOS BIOLÓGICOS

3.3.1 Determinação da Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante das amostras foi avaliada utilizando o método de sequestro de radical difenilpicrilhidrazila (DPPH), empregando espectrofotometria no UV-VIS.

A partir da solução inicial (0,01g de extrato bruto etanólico do pólen para 10 ml de álcool etílico a 70%), diferentes concentrações (20 a 100 µg/mL) dos extratos foram preparadas sendo 1 mL de cada amostra adicionado a 2 mL de uma solução de DPPH (40 µg/mL). Após 30 minutos protegido da luz a absorbância das amostras foi determinada a 517 nm (figura 9). O percentual de inibição das amostras foi calculado pela fórmula que segue: % Inibição = $[\text{Abs DPPH} - (\text{Abs. da Amostra} - \text{Abs. Controle da Amostra}) \times 100] / \text{Abs. O valor}$

de CE₅₀ (concentração de antioxidante necessária para sequestrar 50% dos radicais livres de DPPH) foi calculado a partir de regressão linear da triplicata das amostras. Trolox e ácido ascórbico foram utilizados como controles positivos.

O método de DPPH avalia a ação antioxidante por meio do valor do CE₅₀ (concentração mínima necessária para o antioxidante reduzir em 50% o DPPH inicial da reação). Quanto menor o valor de CE₅₀ encontrado, melhor o potencial antioxidante da amostra analisada (BRAND-WILLIAMS et al., 1995).

A avaliação antioxidante foi feita seguindo metodologia descrita por Re et al. (1999) e Sá et al. (2012) com adaptações.

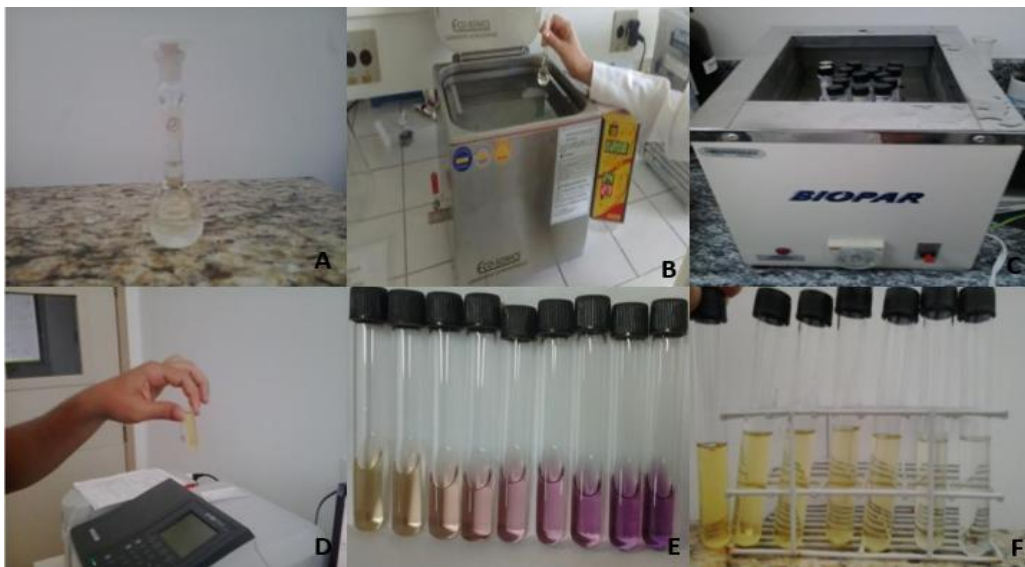


Figura 9: preparação para a realização do teste de DPPH. A- Solução inicial utilizada no teste; B- solução no ultrassom para dissolução da substância (pólen); C- Amostras em banho Maria durante a leitura das amostras; D- Leitura das amostras no espectrofotômetro; E- Amostras no início da leitura; F- Amostras no final da leitura.

3.3.2 Animais Utilizados

Para os testes farmacológicos foram utilizados camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, heterogêneos, adultos, machos com exceção do teste toxicológico, onde foram utilizadas fêmeas (motivo maior sensibilidade), com peso entre 25 a 35 g, os quais foram fornecidos pelo Biotério Central da UEFS. Os animais foram separados por grupos (controle, padrão e doses de 75, 150 e 300 mg/kg), e mantidos em gaiolas de polipropileno com tampas, contendo uma cama de serragem selecionada, com garrafa acoplada a um bico

de aço inoxidável para água, e cocho para ração do tipo peletizada (figura 10), ambos fornecidos *ad libitum*.



Figura 10: Gaiola de polipropileno utilizada no armazenamento dos animais

A sala foi mantida a uma temperatura estável com variação entre de 20 a 22°C, com ciclos de 12 h claro / 12 h escuro (fase clara de 06h00 as 18h00), de acordo com os padrões recomendados para roedores (GHIRALDINI, 1995; MERUSSE; LAPICHICK, 1996).

Para a realização dos experimentos os animais foram transferidos nas devidas gaiolas para a sala de experimentação com no mínimo duas horas de antecedência, para que se ambientalizassem, a fim de se evitar possíveis alterações fisiológicas e comportamentais decorrentes do estresse que pode ser causado pela remoção e manuseio dos animais.

Os animais foram utilizados nos experimentos uma única vez, com exceção dos testes que necessitaram de pré-teste (nesses os animais foram submetidos a um pré-teste que verificou sua aptidão para o teste do dia seguinte). Após os testes, os camundongos foram sacrificados por aprofundamento da anestesia (cetamina associada à xilazina na dose de 5 mg/kg), administração por via intraperitoneal. Os testes foram realizados no decorrer de todo dia (entre 8:00 e 17:00 h).

A higienização das bancadas para a realização dos experimentos foi realizada utilizando etanol a 70%, sendo que durante a execução dos testes foi utilizado uma solução de etanol a 10% (de baixa graduação) nas bancadas e nos aparelhos para evitar assim qualquer tipo de interferência nos resultados.

Este projeto foi submetido à análise e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/ UEFS, sendo registrado sob o número de protocolo 010/2015 CEUA/UEFS, (anexo 1).

3.3.3 Teste Toxicológico

Estudo de Toxicidade Aguda

O experimento foi realizado baseado na *Organization for Economic Cooperation and Development*, Guia OECD-420/2001 com algumas alterações. Foram selecionados dois grupos de animais, camundongos fêmeas com peso entre 25 a 30g, para administração das substâncias. Foram formados; grupos (controle e dose 300 mg) contendo 5 camundongos cada. A amostra do EEP da espécie *C. torrelliana* foi pesada (cálculos da dosagem baseados na média do peso do animal e dose a ser administrada) e diluídos em soro fisiológico (Solução salina (NaCl 0,9%)), sendo administrado por via oral nos animais (dose 300 mg/kg) em dose única. No grupo controle foi administrado solução salina (NaCl 0,9%) também por via oral.

Após a administração das substâncias, os camundongos foram observados durante 24 horas, principalmente nas primeiras 4 horas iniciais (os primeiros 0:30m, 1:00h e após a cada uma hora), onde se analisou alterações morfológicas e fisiológicas a exemplo de agressividade, piloereção, ptose, diarreia, cianose, limpeza, atividade motora, convulsões, etc. A análise do comportamento do animal seguiu-se diariamente até completar 14 dias de experimentação. Houve ainda análise do peso corpóreo dos camundongos no 1º, 7º e 14º dia.

Após o último dia de observação os animais foram sacrificados por aprofundamento da anestesia e seus órgãos foram pesados.

3.3.4 Teste para Avaliar a Coordenação Motora (Rota Rod)

Neste teste os animais são colocados sobre um cilindro giratório, aparelho Rota Rod, marca insight (figura 11), durante velocidade constante, Sendo analisada a habilidade de permanência (equilíbrio) desses animais na barra giratória. (MATTEI; FRANCA, 2006). Houve uma pré-seleção 24h antes da execução desse teste. Aos camundongos pré-seleção não foi administrado nenhuma substância, o que evita interpretação inadequada de dados obtidos devido à inaptidão normal dos animais em manter-se equilibrados e em locomoção na barra giratória. Todos os animais que se mantêm na barra giratória (velocidade de 7 r.p.m) no período de 180 segundos, por até três tentativas, são considerados adequados para o teste. (MENDES et al, 2002). Os camundongos pré-selecionados foram divididos em cinco grupos

de seis animais (controle, padrão e doses), foi realizada uma leitura basal antes da realização do tratamento, medindo-se o tempo de permanência no aparelho conforme descrito anteriormente. Em sequência, os camundongos foram tratados com o veículo (grupo controle) ou com as frações do extrato do pólen da espécie *C. torelliana*, (v.o.) nas doses de 75, 150 ou 300 mg/Kg e um grupo padrão (diazepam 1,5 mg/Kg), e submetidos ao teste aos 60 e 120 minutos após o tratamento, para novamente ser feito o registro do tempo de permanência (s) de cada animal na barra giratória.



Figura 11: Aparelho de Rota Rod utilizado no teste da coordenação motora de animais

3.3.5 Teste das Contorções Abdominais Induzidas pelo Ácido Acético

Nesse teste, a injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,8%) promove uma reação nociceptiva, que provoca contorções abdominais sequenciadas de extensões dos membros posteriores (ALMEIDA, R. N., 2006).

O ácido acético atua promovendo uma irritação local, gerando a dor indiretamente através da liberação de mediadores endógenos que são responsáveis pela estimulação dos neurônios nociceptivos periféricos (COLLIER et al., 1968; DERAEDT et al., 1980).

Nesse experimento foram utilizados cinco grupos com seis animais, onde os mesmos foram tratados com as frações do EEP da espécie *C. torelliana*, nas doses de 75, 150 ou 300 mg/Kg (v.o), um grupo controle, recebeu o veículo (NaCl 0,9%) e um grupo padrão, tratado com indometacina (20 mg/Kg). Após 30 e 60 minutos da administração dos tratamentos para

padrão e doses respectivamente, os animais foram tratados com solução de ácido acético 0,8% (i.p), sendo colocados em caixas de polipropileno individuais, medindo 12 cm de altura, 19 cm de largura e 30 cm de comprimento (figura 12), onde foram registrados o número total de contorções abdominais apresentadas por cada animal durante 20 minutos, sendo que nos primeiros 5 minutos as contorções não foram contabilizadas. O controle não necessita de tempo para reação, já que nesse grupo não é administrado nenhum tipo de droga, o qual recebe apenas solução salina.



Figura 12: Caixa de polipropileno utilizada para observação de animais durante o teste do ácido acético.

3.3.6 Teste da Formalina

O teste da formalina é uma técnica consolidada que investiga de forma confiável a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos, sendo considerado um modelo bifásico de comportamento indicativo de dor persistente, produzida pela injeção subplantar do agente nociceptivo (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Foram utilizados nesse experimento grupos com seis camundongos cada, sendo que os animais foram tratados com três doses das frações do extrato do pólen da espécie *C. torelliana*, nas doses de 75, 150 ou 300 mg/Kg (v.o.), o grupo controle recebeu o veículo (NaCl 0,9%) e outro grupo foi tratado com o padrão (indometacina 10 mg/kg). Após 30 e 60 minutos o grupo padrão e doses respectivamente, receberam 20 μ L de formalina (2,5% formaldeído em solução salina), a qual foi injetada na região subplantar da pata posterior

direita. Em seguida os animais foram colocados em caixas de vidro individuais de observação (figura 13) e o tempo gasto, em segundos, na lambida da pata injetada foi considerado indicativo de nocicepção. A primeira fase da resposta nociceptiva normalmente ocorre entre 0-5 minutos e a segunda ocorre entre 15-30 minutos após a injeção de formalina. Para o grupo controle não é necessário aguardar tempo de reação.



Figura 13: Caixa de vidro utilizada na observação dos animais no teste da formalina.

3.3.7 Teste da Placa Quente

O teste da placa quente é usado para medir as latências de resposta de acordo com o método de Vaz, et al. (1997 apud Chol, 2007). Nesse teste os animais são pré-selecionados 24h antes da execução do mesmo, sendo critério para serem considerados aptos a sua permanência na placa quente a uma temperatura entre 50 e 55°C por 10s sem lambe as patas posteriores ou saltar. Para o teste, foram utilizados cinco grupos contendo seis camundongos cada (controle, padrão e doses 75, 150 e 300 mg/kg). Os camundongos foram colocados numa proveta de vidro de 50 cm de diâmetro sobre a superfície aquecida do aparelho hot plate da marca insight (figura 14), e o tempo em segundos (s), entre a colocação destes, e as reações de agitação ou lambida nas patas ou mesmo pulo foi registrado como o índice de latência de resposta. Um automático de 30 s de corte é utilizado para prevenir danos nos tecidos. Os animais foram pré-tratados 30 minutos antes da colocação destes na placa quente com doses 75, 150 e 300mg/kg, o grupo padrão (morfina 10 mg/Kg) e o controle com veículo (NaCl a 9%), sendo que o grupo controle não necessita aguardar tempo de reação.

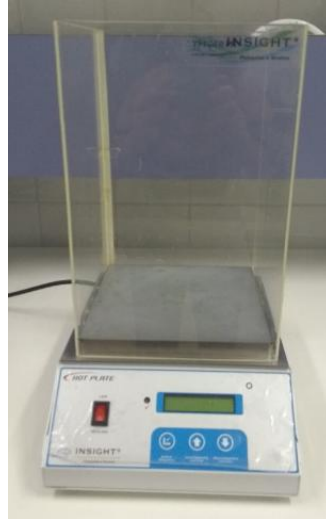


Figura 14: Equipamento hot plate, utilizado no teste da placa quente.

3.3.8 Teste do Edema da Pata Induzido por Carragenina

São três as diferentes etapas envolvidas no teste do edema de pata induzido pela carragenina, conforme os mediadores implicados nesse processo. Na primeira fase (0-90 minutos), ocorre a liberação de mediadores químicos como as aminas vasoativas (histamina e serotonina). Essas elevam a permeabilidade vascular, além de causar vasodilatação no princípio do processo inflamatório. Entre 90-150 minutos é decorrente a segunda etapa do processo, nesta fase as cininas estimulam o acréscimo na permeabilidade dos vasos sanguíneos e a biossíntese de prostaciclina e outros autacóides envolvidos no processo inflamatório. A partir de 150 minutos inicia-se a terceira e última etapa do processo, nesse período há uma elevação na produção de prostaglandinas no tecido inflamado, demonstrando seu maior pico em 180 minutos. É nesse momento que os leucócitos polimorfonucleares serão introduzidos maciçamente (UENO et al., 2000; BATISTA, et al., 2016).

O teste do edema de pata induzido pela carragenina é feito utilizando-se cinco grupos com seis camundongos. Os animais foram tratados com a solução do EEP da espécie *C. torrelliana*, por via oral nas doses de 75, 150 e 300 mg/Kg. Outro grupo de animais foi tratado com indometacina na dose de 10 mg/kg e o grupo controle, tratados com veículo (NaCl a 0,9%). Após 30 e 60 minutos, os animais do grupo padrão e doses, respectivamente, receberam 50 μ L de carragenina (2,5% diluída em solução salina) a qual foi injetada na região subplantar da pata posterior esquerda, e igual volume de solução salina (NaCl a 0,9%) na pata posterior direita (NSONDE NTANDOU et al, 2010). O volume das patas foi medido

utilizando um pletismômetro de pata da marca insight (figura 15) imediatamente após a administração da carragenina e da solução salina na região subplantar e após 60, 120, 180 e 240 minutos. Foi considerado edema a diferença do volume entre a pata tratada com carragenina e a que recebeu a solução salina.

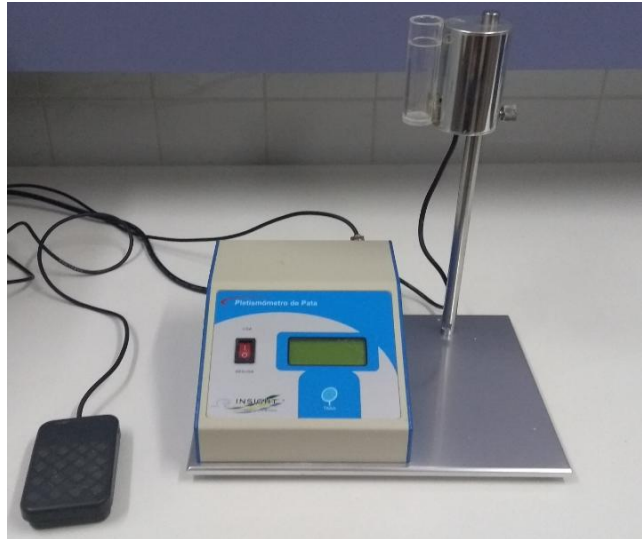


Figura 15: Pletismômetro, aparelho utilizado no teste do edema de pata induzido por carragenina.

4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

4.1 Análise Estatística dos Testes Químicos

No teste químico foi utilizado o programa Excel para o cálculo da média e desvio padrão do teor de fenólicos e flavonoides totais, do extrato da espécie *Corymbia torelliana*.

4.2 Análise Estatística dos Testes Biológicos

Os dados obtidos nos experimentos foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M) e analisados pelo teste ANOVA (análise de variância) de uma via seguida do teste Tukey para as múltiplas comparações entre os grupos ou quando necessário o teste de Dunnett, sendo exceção para o teste do Edema de Pata, onde o teste utilizado foi ANOVA two way. O programa estatístico utilizado foi o *Graph Pad Prism*, versão 5.0. Os resultados foram considerados significativos quando $p < 0,05$ (WINER, et al, 1991).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição química

O extrato etanólico do pólen (EEP) da espécie *C. torelliana* apresentou rendimento equivalente a 27,5%, valor este mais expressivo do que os encontrados por Villarreal et al. (2009), que ao estudar compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra* na região amazônica, encontrou extrativos equivalentes a 15,6%.

Segundo Tiwari et al. (2011), vários são os fatores que interferem na extração de substâncias, estando entre esses fatores o método utilizado, o material a ser extraído, tamanho da partícula, solvente empregado, temperatura, tempo de remoção, concentração do solvente e polaridade.

Sendo assim, pode-se presumir que a diferença entre os rendimentos no extrato estudado e o citado na literatura, pode estar associada a alguns fatores, a exemplo da concentração do solvente utilizado na extração (etanol 70%). Carpes et al. (2007), em estudo das preparações de extratos de pólen apícola em diversas concentrações (40, 50, 60, 70, 80, 90%), detectaram um melhor rendimento em amostras extraídas em etanol a 70 e 80%. Outro fator que pode ter influenciado na obtenção de um melhor rendimento do extrato é a temperatura de extração, levando em consideração que a extração a quente, muitas vezes potencializa esse processo.

Na triagem fitoquímica por cromatografia em camada delgada foram obtidos resultados positivos para os reagentes anisaldeído em ácido sulfúrico (terpenos e esteroides), Libermann-Burchard (triterpenos e esteroides) e NP/PEG (ácidos fenólicos e flavonoides). A presença de classes como cumarinas e alcaloides não foram detectadas.

Lawal et al. (2012) através da triagem fitoquímica de extratos de *Corymbia torelliana* detectou a presença de taninos, saponinas triterpênicas e glicosídeos cardíacos nas folhas e cascas da espécie e antraquinonas apenas nas folhas de *C. torelliana*. Dados esses que corroboram em parte com os encontrados no presente estudo para pólen da mesma planta (presença de terpenos, flavonoides e esteroides).

Para outras espécies da mesma família é possível verificar a presença de grande parte dos metabólitos identificados para a espécie analisada no presente estudo. Um exemplo é o estudo realizado por Fiuza et al. (2008), que na triagem fitoquímica de folhas da espécie

Eugenia uniflora (Myrtaceae) detectou a presença de antraquinonas, esteroides, triterpenos, heterosídeos flavonoidicos, heterosídeos saponínicos e taninos. O referido autor não detectou presença de alcaloides, amido, cumarinas e heterosídeos digitálico. Já Silva e Lima (2016) estudando as classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas também da espécie *Eugenia uniflora* L. confirmou a presença de flavonoides, esteroides e terpenos, entre outros metabólitos.

Dados semelhantes foram encontrados por Valério (2014), que ao analisar o extrato hidroetanólico de *Eucalyptus alba* (Myrtaceae) detectou a presença de ácidos orgânicos, saponinas espumídicas, fenóis e taninos, lactonas sesquiterpênicas, esteroides e triterpenoides. Esses dados corroboram em grande parte com os dados apresentados para espécies pertencentes à família Myrtaceae, a qual tem demonstrado presença constante de grande parte desses metabólitos, assim como foi detectado para o pólen da espécie *C. torelliana*.

Os resultados encontrados para a triagem fitoquímica colocam o pólen de *C. torelliana* como uma boa fonte nutricional, visto que, essa fonte alimentar se demonstrou rica em componentes essenciais ao bom funcionamento do organismo humano. Segundo Podsedek (2007); Silva, M. L. C. et al. (2010), pesquisas apontam que o elevado consumo de vegetais está relacionado com a diminuição no risco de diversas doenças como aterosclerose e câncer. Atuação essa imputada a compostos com atividade antioxidante a exemplo dos compostos fenólicos, um dos principais antioxidante presente em diversas partes dos vegetais, inclusive no pólen.

Os dados encontrados na determinação do teor de compostos fenólicos e flavonoides estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1: Media e desvio padrão de fenólicos e flavonoides totais do extrato etanólico do pólen de *C. torelliana*.

Extrato	Média Abs	Concentrações do extrato	
		Valores individuais	Média ± desvio padrão
EXT. ETAN. BRUTO DO PÓLEN DE <i>C. torelliana</i> (Flavonoides totais)	0,487	26,43	35,81 ± 8,37 mg EQ/g
	0,681	38,48	
	0,746	42,51	
EXT. ETAN. BRUTO DO PÓLEN DE <i>C. torelliana</i> (Fenólicos totais)	0,242	107,36	116,21 ± 7,80 mg EAG/g
	0,268	119,18	
	0,274	122,09	

As análises demonstraram médias de fenólicos totais de $116,21 \pm 7,80$ mg EAG/g de extrato, superior a alguns encontrados na literatura, a exemplo de Menezes (2009) que ao investigar pólen apícola, encontrou valores médios de fenólicos totais de 44,28 mg EAG/g de extrato bruto de pólen, variando entre 14,31 e 132,39 mg EAG/g de extrato. Porém a mesma autora, Menezes (2010), analisando compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), verificou que em amostras de pólen apícola com excessiva ocorrência de *Eucalyptus* (mesma família da espécie analisada), ocorreu um aumento no teor de compostos fenólicos observados, variando de 26,48 a 132,38 mg EAG/g de extrato.

Magina et al. (2010) encontrou para extratos de folhas de espécies da família Myrtaceae como *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia umbelliflora*, valores de fenólicos totais de $162,6 \pm 3,3$, $138,0 \pm 2,7$, $128,1 \pm 2,9$ mg AG/g respectivamente, valores estes próximos aos valores encontrados para *C. torelliana*.

O teor de flavonoides detectado nas amostras analisadas, demonstrou uma média de $35,8 \pm 8,37$ mg EQ por grama de pólen analisada, sendo quantificados através de uma curva padrão de quercetina ($R^2 = 0,9922$) (Gráfico 2).

Em pólen apícola valores inferiores de flavonoides totais são relatados, como em Menezes (2009) que ao analisar o extrato de pólen apícola, encontrou um teor médio de 1,40 mg EQ/g de extrato de pólen apícola, variando de 0,62 a 2,51 mg EQ/g de extrato. Ainda a mesma autora em 2010, analisando compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzido por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.), encontrou teores de flavonoides totais para o extrato do pólen apícola, que variaram de 0,72 a 1,99 mg EQ/g de extrato, com média de $1,10 \pm 0,03$ mg EQ/g de extrato. Rocha (2013) identificou valores médios de $6,99 \pm 0,33$ mg CAE/g para pólen seco e $6,58 \pm 0,29$ mg CAE/g para pólen fresco, valores estes superiores a Menezes (2009; 2010), porém inferiores ao encontrado no presente estudo.

Já quando comparado os resultados encontrados para o EEP de *C. torelliana* com dados de Magina et al. (2010) com extrato de folhas de espécies pertencentes à mesma família botânica (Myrtaceae), onde os autores encontraram teores de flavonoides para *Eugenia brasiliensis*, *Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia umbelliflora* de $14,4 \pm 1,1$, $31,2 \pm 1,7$, $10,4 \pm 1,1$ mg QE/g, respectivamente, nota-se que os valores encontrados são inferiores ao encontrado no presente estudo.

O teor de compostos fenólicos totais e flavonoides totais, encontrado para o EEP de *C. torelliana*, evidencia o potencial dessa espécie para futuras contribuições como fonte

nutricional e terapêutica. Estudos apontam flavonoides e terpenos como substâncias que possuem um bom potencia terapêutico em relação a varias enfermidades a exemplo de processos inflamatórios. Segundo Mello e Santos (2001), A atuação do tanino em processos inflamatórios ocorre através da construção de um revestimento (complexo tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre o tecido lesado, o que possibilita o mecanismo de restauração de forma mais natural e eficaz.

Koo e Suhaila (2001), mencionam a diversidade dos efeitos farmacológicos e biológicos dos flavonoides, entre os quais sobressaem ações antioxidante, antiinflamatória e antiplaquetária, assim como função antialergênica. Ainda ocorre inibição de enzimas distinguindo-se as prostaglandina sintetase, lipoxigenase e a ciclooxygenase, enzimas estas correlacionadas com a tumorogênese. Outra função é a incitação de enzimas do sistema desintoxicante a exemplo da glutathione S-transferase. Em relação à atuação dos flavonoides em alimentos, esses atuam reduzindo o consumo de vitamina C, impossibilitando a formação de radicais livres.

5.2 ATIVIDADE BIOLÓGICA

5.2.1 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

No extrato bruto etanólico do pólen de *C. torelliana* (EEP) analisado, foi encontrada uma média e desvio padrão de CE₅₀ de 60,85 ± 4,70 µg/mL (Tabela 2). Embora o valor de CE₅₀ obtido tenha sido superior ao valor dos controles (Trolox e Ácido Ascórbico), o material encontrado demonstrou um potencial antioxidante, principalmente se considerarmos que os extratos são misturas complexas, o que pode vir a interferir em algumas atividades desempenhadas, podendo ocorrer uma provável redução nas propriedades demonstradas. Já os controles, são substâncias utilizadas puras e com alta capacidade de sequestro de radical, facilitando desta forma a sua atuação.

Tabela 2: Atividade antioxidante do extrato bruto etanólico do pólen de *C. torelliana* avaliada através do CE₅₀, valores expressos em: µg/mL.

Amostra	CE ₅₀ ± DP (µg/mL)
EEP <i>Corymbia torelliana</i>	60,85 ± 4,70
Trolox	9,49 ± 0,82
Ácido Ascórbico	7,12 ± 0,66

A eficiência do extrato estudado é presumível, quando comparamos os resultados de CE₅₀ encontrados no estudo a alguns resultados da literatura como Carpes (2008), que fez o estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil, onde encontrou uma média e desvio padrão de CE₅₀ de 1920 ± 103 µg/mL. Rocha (2013), encontrou valores médios de CE₅₀ de 1,16 ± 0,001 mg/mL, para o extrato de pólen seco e 0,74 ± 0,001 para o extrato do pólen fresco. Quando analisada a medida adotada pelo autor, fica claro que o resultado encontrado para o extrato bruto do pólen de *C. torelliana* no presente estudo demonstrou-se mais significativo.

Os cálculos de CE₅₀ são realizados através de uma equação, a qual é gerada por uma curva, onde são utilizados os dados de concentração (µg/mL) e porcentagem de inibição dos extratos testados para a realização dos mesmos. Os cálculos de CE₅₀ dos extratos analisados encontram-se nos gráficos 3, 4, 5.

Vale ressaltar que a atividade antioxidante demonstrada pelo EEP da espécie *C. torelliana* pode ser atribuída à presença de compostos fenólicos em sua composição química, como ácidos fenólicos e flavonoides. Segundo Heim et al (2002), os flavonoides demonstram a habilidade de transmitir elétrons aos radicais livres, permitindo o seu equilíbrio. Além disso, estes metabolitos permitem a atuação quelante de íons metálicos, acionam enzimas antioxidantes, diminuem os radicais livres e inibem as oxidases, sendo todas essas funções atribuídas a proteção que os flavonoides exercem em sistemas biológicos.

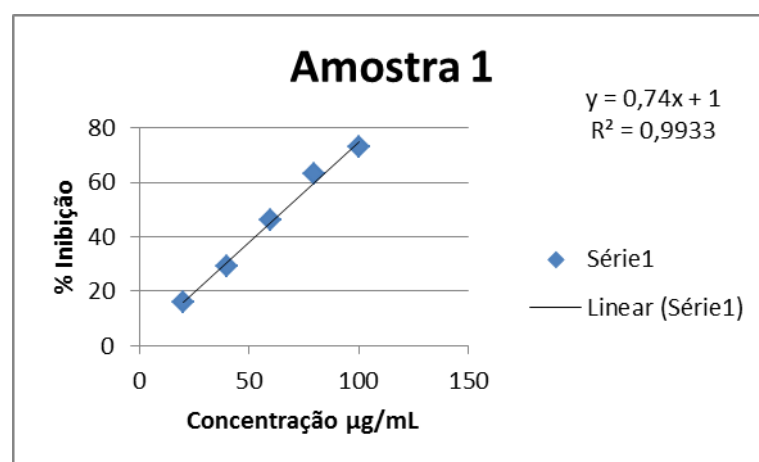


Gráfico 3: Curva para cálculo de CE₅₀ de extratos etanólicos da espécie *C. torelliana*, amostra 1.

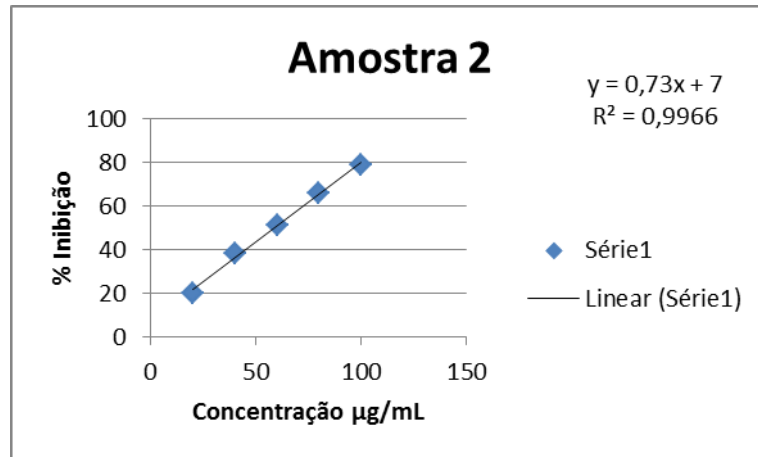


Gráfico 4: Curva para cálculo de CE_{50} de extratos etanólicos da espécie *C. torelliana*, amostra 2.

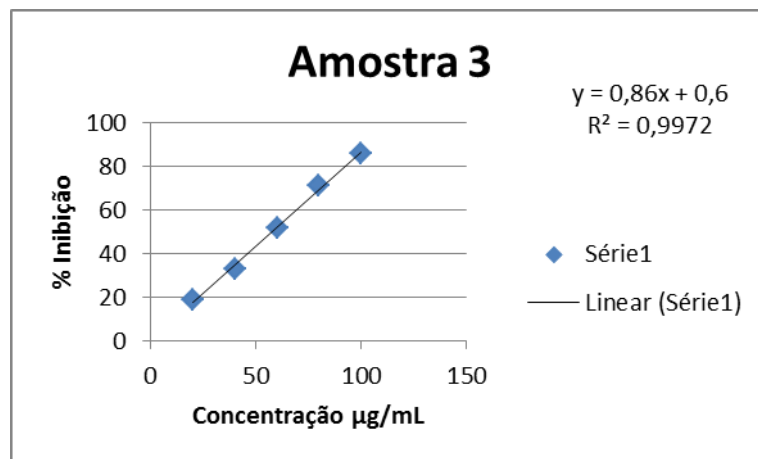


Gráfico 5: Curva para cálculo de CE_{50} de extratos etanólicos da espécie *C. torelliana*, amostra 3.

5.2.2 Teste de Toxicidade Aguda

Um dos mais relevantes problemas no uso indiscriminado e inadequado de plantas medicinais é a convicção de que produtos oriundos de origem vegetal não causam prejuízo a saúde, inexistindo efeitos danosos e ou tóxicos relacionado a esses. Contudo, o uso no decorrer dos milhares de anos demonstrou que algumas plantas medicinais possuem constituintes com potencialidade para colocar a saúde em risco. Estudos indicam que inúmeras dessas plantas contem substâncias com potencialidade para toxicidade, sendo necessária sua aplicação com prudência, respeitando os riscos toxicológicos que estas possuem (RODRIGUES et al, 2011; ALMEIDA, 2014).

Chama-se de toxicidade a característica potencial que uma substância tem em gerar uma enfermidade quando utilizada, ou a interferência causada por esta, quando interage com o

organismo. Algumas informações, tais como sinais, efeitos gerados, dosagens administradas levam a identificação da capacidade de toxicidade das substâncias avaliadas, conduzindo a estimativa do grau de toxicidade das mesmas. Uma maneira de conduzir estudos de toxicidade é utilizando animais nos quais serão melhor administrados compostos ou doses de extratos em quantidades variadas ou dose fixa, podendo efetuar ensaios de toxicidade aguda, subcrônica ou crônica (LIMA, A. P., 2009; TÚRMINA, 2012).

O teste da toxicidade aguda desenvolvido teve como finalidade avaliar a toxicidade do extrato bruto etanólico do pólen da espécie *C. torelliana* na dose de 300 mg/kg, dose máxima a ser administrada nos testes biológicos de analgesia e anti-inflamação em camundongos da espécie *Mus musculus*.

Não foi observada nenhuma toxicidade em relação ao tipo de metodologia adotada para o teste, não havendo ocorrência de mortes entres os 14 dias de observação, assim como, na avaliação da parte comportamental e morfológica não foram detectados nenhuma irregularidade, aspectos esses analisados com base em orientações da OECD 2001. Foram observadas alterações (pele, olhos membros mucosos e respiratórios, sistema circulatório, nervoso autônomo e central, atividade somatomotora e o padrão de comportamento), Havendo atenção especial para observações de convulsões, tremores, salivação, diarreia, letargia, sonolência e coma, revelando uma presumível ausência de toxicidade na dose única de 300 mg/kg utilizada.

Em relação aos dados estatísticos, o teste em questão não revelou nenhuma diferença significativa entre o controle e a dose de 300 mg/kg do extrato etanólico do pólen de *C. torelliana* utilizada, quando comparado o peso dos animais nos dias 1, 7 e 14 (Tabela 3 e Gráfico 6).

Em estudo realizado por Vereda (2013) com uma espécie da mesma família foi observado um efeito sobre os rins de animais tratados com extrato de *Myrcia bela*, demonstrando possível toxicidade dessa referida espécie. Mesmo sendo da mesma família, a espécie *C. torelliana* não apresentou alteração quando foram analisados macroscopicamente os órgãos tratados pelo EEP.

Tabela 3: Peso corporal dos camundongos (controle e dose 300 mg/kg do EEP de *Corymbia torelliana* administrado oralmente).

Peso (dia)	Controle (g)	EEP <i>C. t.</i> (g)
Dia 1	25 ± 1,30	26 ± 2,35
Dia 7	26 ± 1,14	26 ± 2,55
Dia 14	27 ± 0,84	27 ± 3,27

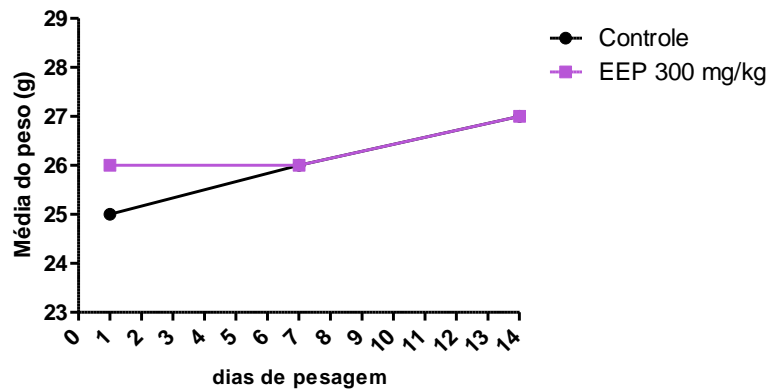


Gráfico 6: Representação da média do peso dos camundongos nos dias 1, 7 e 14, no teste de toxicidade Aguda. (n= 5 animais; ANOVA).

Na análise do peso dos órgãos (coração, pulmão, fígado, estômago, intestino, rim direito e esquerdo e baço) dos camundongos tratados com o EEP de *C. torelliana* ao final do experimento, assim como nos dados anteriores, não se evidenciou nenhuma diferença significativa em relação ao controle e as doses utilizadas. Dados esses expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Peso dos órgãos dos camundongos fêmeas (controle e dose 300mg/kg após EEP da espécie *C. torelliana*) administrado via oral. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

ÓRGÃOS	CONTROLE (g)	EEP <i>C. torelliana</i> (g)
Coração	0,11 ± 0,006	0,13 ± 0,009
Pulmão	0,23 ± 0,013	0,17 ± 0,018
Fígado	1,25 ± 0,076	1,28 ± 0,104
Estômago	0,91 ± 0,184	0,61 ± 0,050
Rim direito	0,14 ± 0,005	0,16 ± 0,013
Rim esquerdo	0,14 ± 0,009	0,15 ± 0,011
Intestino	3,71 ± 0,210	3,77 ± 0,367
Baço	0,10 ± 0,008	0,09 ± 0,011

Segundo Jahn e Günzel (1997), algumas pesquisas desenvolvidas com foco em toxicidade, análises clínicas, averiguação do peso de órgãos, assim como modificações do peso corporal, é um bom parâmetro para fornecer uma avaliação do bom funcionamento orgânico de animais. Sendo assim, a ausência de alterações entre os pesos dos órgãos assim como o peso dos animais do grupo controle e o grupo tratado com o EEP, inexistência de alterações comportamentais entre esses grupos e ausência de mortalidade, são bons indicativos da presumível escassez de toxicidade do extrato analisado, visto que a toxicidade traz malefícios que alteram o funcionamento orgânico e com isso modificações na estrutura orgânica dos seres.

Embora o EEP não tenha apresentado sinais visíveis de toxicidade, não acarretando mortes, nem alterações nos animais no período do experimento, seria interessante a realização de estudos mais aprofundados sobre a toxicidade, utilizando outras técnicas a exemplo dos estudos de toxicidade aguda com doses repetidas, garantindo dessa forma maior segurança no uso dessa substância futuramente.

5.2.3 Teste Rota Rod

O teste do Rota Rod vem sendo utilizado em fases antecipadas nos estudos experimentais pré-clínicos de medicamentos com o propósito de detectar efeitos contrários motores e sistêmicos que possivelmente apareceriam de forma tardia na fase IV de estudos clínicos, na fase de farmacovigilância, e em pesquisas experimentais para efeitos motores adversos de fármacos, como etanol e benzodiazepínicos (PINTO; KO, 2012).

Segundo Lopes et al. (2014), esse teste foi realizado com o intuito de verificar a coordenação motora e equilíbrio em roedores, podendo desta forma avaliar as suas funções motoras. Camundongos foram avaliados após a administração de doses (75, 150, 300 mg/kg) do extrato bruto etanólico do pólen da espécie *C. torelliana*. Nenhuma diferença significativa foi observada entre as doses utilizadas (75, 150 e 300 mg/kg) e o controle, (Gráficos 7 e 8), sendo detectado 0% de interferência das doses na coordenação motora dos animais analisados, dado esse de grande relevância na análise das atividades farmacológicas de uma determinada substância.

Nunes (2012), avaliando o efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* Cambess, família Myrtaceae na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais de roedores, observou que o extrato não demonstrou alterações no número de quedas dos animais durante o período avaliado para a única dose administrada no estudo (250 mg/kg).

Em pesquisa realizada por Almeida, (2014), onde o autor estudou o efeito farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica*, espécie pertencente à família Myrtaceae, também não foi detectado pelo autor nenhuma incoordenação motora nos animais analisados.

Outro fator observado no estudo foi a ausência de implicações locomotoras bifásicas, quando da administração de doses variadas do EEP (75, 150, 300 mg/kg), onde os efeitos se mantiveram constantes entre as doses estudadas. Segundo Rustay et al. (2003); Araújo, F. Y. R. (2011), este efeito bifásico é comum em agentes depressores, os quais, a depender da dosagem administrada, podem apresentar estímulo em dosagem baixa e em doses maiores apresentar quadro de sedação.

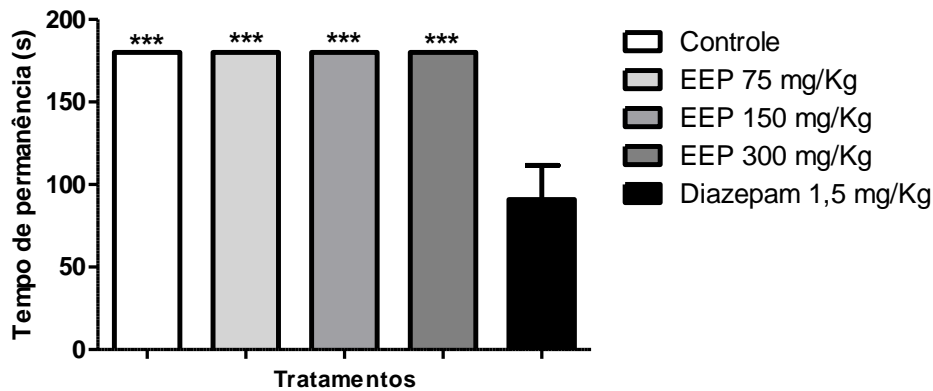


Gráfico 7: Efeito do EEP de *C. torelliana* sobre a coordenação motora dos camundongos no tempo de 60 min. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

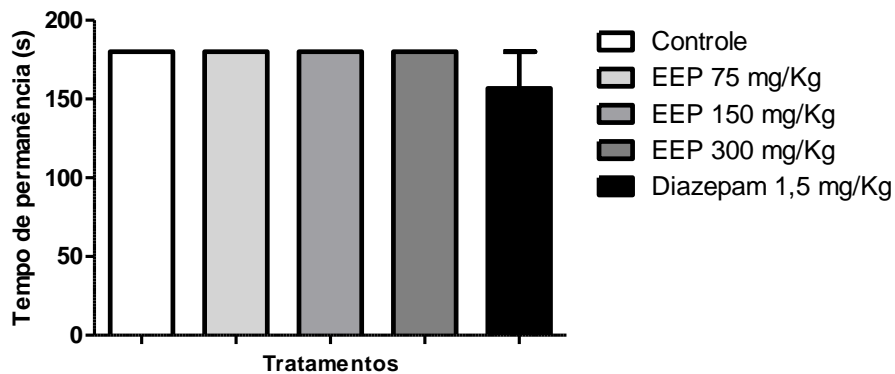


Gráfico 8: Efeito do EEP de *C. torelliana* sobre a coordenação motora dos camundongos no tempo de 120 min. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

Vale ressaltar que no momento do teste, foi observada uma diminuição na agitação dos camundongos, sem nenhuma alteração das funções motoras analisadas no experimento em questão, dado esse que precisa ser investigado em testes posteriores, para a averiguação de outros tipos de atividade desempenhada pelo EEP em questão, a exemplo de testes ansiolíticos, como teste do campo aberto, teste do labirinto em cruz elevada, etc.

5.2.4 Teste do Ácido Acético

No teste do ácido acético realizado, todas as doses (75, 150, 300 mg/kg) do extrato do pólen de *C. torelliana* demonstraram diferenças significativas em relação ao controle analisado, evidenciando uma redução significativa das contorções abdominais nos animais utilizados. A eficiência do extrato analisado foi comparável ao padrão empregado (indometacina 10 mg/kg), entre os quais não houve diferença estatística (Gráfico 9).

Embora todas as doses tenham apresentado uma resposta satisfatória, reduzindo as contorções abdominais em 78%, 62,5% e 62,5% para as doses administradas (75, 150, 300 mg/kg) respectivamente, foi verificada uma melhor resposta na menor dose administrada (75 mg/kg), sugerindo um potencial analgésico significativo, além de uma vantagem econômica na obtenção da matéria-prima a ser utilizado para a produção do extrato, o que torna futuramente a aquisição e produção do EEP economicamente mais viável.

Nunes (2012), avaliando o efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* Cambess (Myrtaceae) na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais de roedores, verificou uma redução no número de contorções abdominais em 32,57% e 55,79% para as doses analisadas, respectivamente (125 e 250 mg/kg), valores esses menos expressivos que os valores encontrados no estudo para EEP de *C. torelliana*.

Já Alvarenda et al. (2015), estudando a atividade antinociceptiva e antimicrobiana da casca do caule de *Psidium Cattleianum* Sabine (Myrtaceae) detectou um índice de inibição das contorções abdominais em 54,39%; 75,31% e 86,19% em resposta ao tratamento com o extrato nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente. Os dados encontrados pelos autores são próximos ao encontrado no presente estudo, sendo que o referido autor encontrou dados que levam a uma curva de dose dependência. Já os resultados para EEP de *C. torelliana* indicaram uma inibição maior na menor dose administrada (75 mg/kg). Presume-se que este fato esteja associado a uma especificidade de atuação nessa dose, sendo as doses de (150, 300 mg/kg) mais amplas no seu funcionamento, vindo a alcançar alvos de forma mais ampla.

Com base nos dados encontrados até o momento e nos resultados da composição química do EEP, a qual detectou a presença de metabólitos secundários, como compostos fenólicos, terpenos e esteroides, é possível sugerir uma presumível atuação do EEP sobre os canais (TRP) a exemplo dos Vanilóides (TRPV), canais ASICs ou mesmo canais de atuação semelhante a esses. Esses canais podem ser estimulados através da dissociação de prótons presentes no ácido acético, vindo a influenciar na atuação dos mediadores endógenos, a exemplo da prostaglandina ou mediadores semelhantes a esse.

Segundo Rotelli et al. (2003), certos flavonoides demonstram a habilidade de impossibilitar a ação da ciclooxygenase e a lipoxigenase no metabolismo do ácido araquidônico, o que pode colaborar para as características anti-inflamatórias.

Além disso, Middleton et al. (2000), afirma que os flavonoides são capazes de bloquear a atuação das enzimas fosfolipase A2 e a fosfolipase C, presentes na membrana plasmática das células, sendo essas enzimas de grande relevância no mecanismo que aciona os mediadores dos processos inflamatórios. Vale ressaltar que as enzimas em questão estão envolvidas na produção de prostaglandinas, mediadores endógenos esses envolvidos no mecanismo da dor.

Embora tenha sido detectado o indicativo de atividade analgésica no EEP, outros testes que podem confirmar essa atividade foram realizados e discutidos logo a seguir.

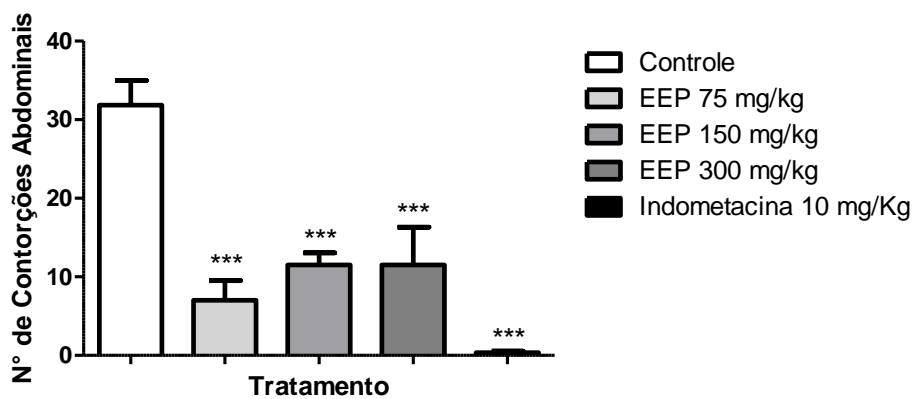


Gráfico 9: Efeito do EEP de *C. torelliana* no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

5.2.5 Teste da Formalina

No teste da formalina ocorre a avaliação de duas fases (aguda e tardia). Ambas as fases apresentam propriedades distintas que permitem investigar substâncias analgésicas, assim como esclarecer o mecanismo de analgesia (SHIBATA et al., 1989; CECÍLIA e MURGAS, 2014).

Efeitos diversos estudados em três classes de analgésicos, testados isoladamente em ambas as fases, surgem que a etapa inicial deve ser devido a sua eficiência sobre nociceptores de forma direta, podendo essa fase ser interrompida por analgésicos de ação central. Em contraposição, a fase tardia presume-se ocorrer devido a uma resposta inflamatória em parte intermediada por prostaglandinas, podendo ser inibida por AINEs e esteroides, bem como fármacos de ação central (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

O teste da formalina realizado nesse estudo demonstrou que, mesmo havendo uma redução no tempo de lambida das patas dos camundongos na primeira fase (fase neurogênica), não houve diferenças significativas entre o controle e nenhuma das doses administradas (75, 150, 300 mg/kg) do extrato do pólen da espécie *Corymbia torelliana* utilizada. Já na segunda fase (fase inflamatória) houve uma diferença significativa entre o controle e as doses utilizadas (Gráficos 10 e 11). As doses demonstraram ação equivalente àquela apresentada pelo padrão utilizado (indometacina), o que sugere uma possível semelhança no mecanismo de ação dos extratos utilizados com o padrão, o qual possui ação anti-inflamatória, atuando na inibição da síntese de mediadores químicos (prostaglandinas), diminuindo consideravelmente a resposta inflamatória.

Os resultados ainda indicam uma ação analgésica por parte do extrato analisado, a qual fica evidenciada pela elevada inibição da nocicepção gerada no processo inflamatório caracterizada na segunda fase do teste, onde o extrato utilizado inibiu em 98%, 97% e 97% o tempo de lambida da pata para as doses de 75, 150 e 300 mg/kg respectivamente, não havendo diferença significativa entre as doses analisadas e o padrão (inibição de 97%).

Em estudos realizados por Basting et al. (2014), onde foram analisados os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório do extrato da folha de *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae), foi detectado um efeito antinociceptivo na segunda fase do teste da formalina, havendo uma inibição de 41, 63 e 36%, para as doses de 125, 250 e 500 mg/kg, respectivamente. Quando comparado os resultados dos autores com os dados encontrados no presente estudo, os resultados de nocicepção do EEP de *Corymbia torelliana* se demonstraram mais expressivos.

Componentes químicos como compostos fenólicos e terpenos possuem relatos da sua participação em processos analgésicos e anti-inflamatórios. Hosseinzadeh et al. (2011), em estudo com os extratos aquoso e etanólico das partes aéreas de *Myrtus communis* L. família Myrtaceae, detectaram uma atuação central e periférica quando analisado os efeitos antinociceptivos e anti-inflamatório para mesma. O mesmo autor ainda atribui os efeitos mencionados a presença de flavonoides e ou terpenos.

Com os resultados observados, é possível sugerir uma presumível atuação do EEP de *C. torelliana* sobre as enzimas COX ou enzimas com atuação semelhante a estas, as quais influenciam no processo de atuação e síntese de prostanoídes, a exemplo da prostaglandinas, ou de mediadores equivalentes a esses. Foi ainda observada, além da possível ação analgésica para essa espécie, uma atividade anti-inflamatória, a qual pode ter uma confirmação no teste do edema de pata induzido por carragenina realizado posteriormente.

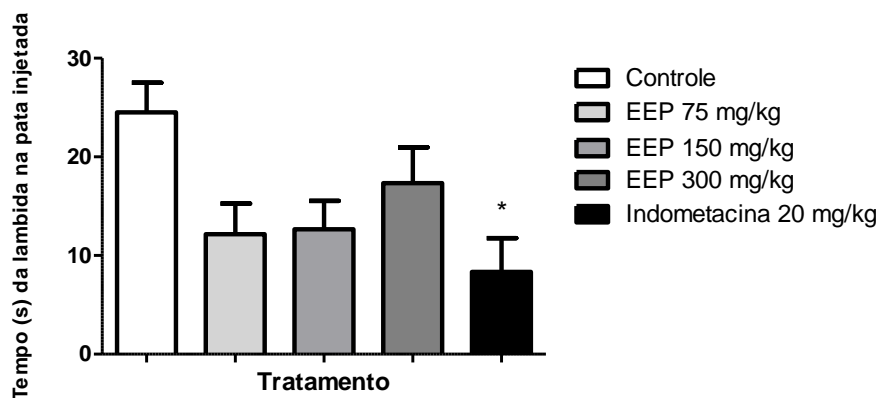


Gráfico 10: Efeito do EEP de *C. torelliana* no tempo de lambida das patas dos camundongos na 1ª fase (fase neurogênica) do teste da formalina. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

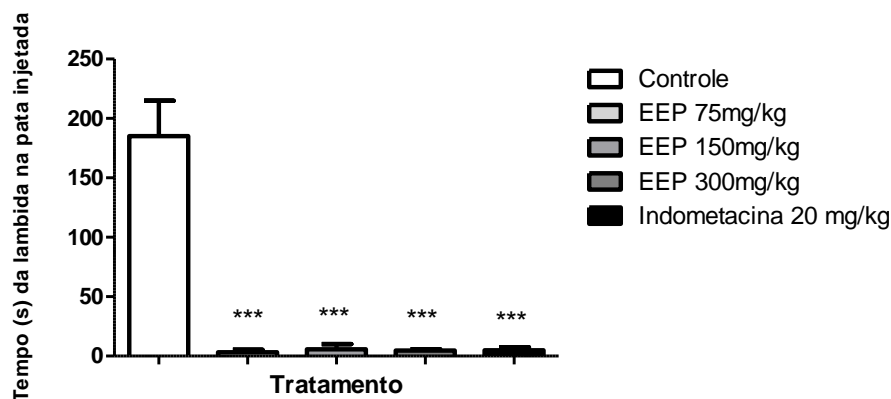


Gráfico 11: Efeito do EEP de *C. torelliana* no tempo de lambida das patas dos camundongos na 2ª fase (fase inflamatória) do teste da formalina. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

5.2.6 Teste da Placa Quente

Nesse tipo de teste os camundongos analisados demonstram uma reação à incitação térmica relacionada a neurotransmissores centrais, estes são vulneráveis aos analgésicos de intervenção central. Nesse procedimento, estímulos térmicos provocam nociceptores que conduzem informação a locais precisos do sistema nervoso central, levando a um *feedback* nociceptivo organizado (MEKONNEN et al., 2009; BATISTA et al., 2016).

O teste em questão revela a existência de diferenças significativas entre o controle e a dose de 75 mg/kg do extrato administrada em todos os tempos do experimento (30, 60 120 min), assim como foi constatado com o padrão utilizado (morfina 10 mg/kg), substância esta de atuação conhecidamente central (Gráfico 12).

Embora os resultados tenham sido obtidos em todos os tempos do experimento, foi verificado um melhor resultado no tempo de 30 minutos, quando os camundongos aumentaram o tempo de latência, resultando em um aumento do tempo de permanência na placa quente sem saltar nem lambar ou morder as patas traseiras em até 109%, 54,5% e 100% para as doses do extrato de *C. torelliana* administradas de 75, 150 e 300 mg/kg, respectivamente. A dose de 75 mg/kg nesse tempo alcançou uma percentagem ainda superior ao padrão utilizado, o que sugere uma eficiência equivalente ao mesmo. Embora os resultados obtidos até o momento nos demais testes tenha sugerido uma atuação periférica, o teste da placa quente sinaliza também para uma possível atuação analgésica central do extrato analisado, onde os resultados mostram uma eficiência da dose de 75 mg/kg em todos os tempos e de forma contínua como já mencionado, característica essa geralmente verificada em drogas com ação central.

Em estudo com extrato de folhas da espécie *Eugenia punicifolia* (pertencente à família Myrtaceae), Basting et al. (2014) encontraram um aumento na latência como resposta nociceptiva induzida pelo calor, sendo que de três doses (125, 250 e 500 mg / kg) utilizadas pelo autor, a menor dose não demonstrou nenhum efeito. Quando compara-se esses resultados aos encontrados no presente estudo, fica evidente a maior potencialidade analgésica do EEP da espécie *Corymbia torelliana*, que foi eficaz em todas as doses administradas.

Levando em consideração o tipo de teste realizado (placa quente) e o considerável aumento no tempo de permanência dos animais na placa em todos os tempos analisados, é possível supor que o EEP da espécie *Corymbia torelliana* está atuando na ativação de nociceptores existentes nas fibras aferentes periféricas, exemplo da fibra C, a qual, segundo Millan (1999) apresenta receptores termossensíveis, respondendo ao aquecimento, assim

como à diminuição de temperatura. Esses receptores possuem mecanorreceptores de baixo limiar e receptores exclusivos para substâncias que promovem a sensação dolorosa, a exemplo da prostaglandina, havendo ainda um tipo fundamental de fibra C, que responde a altos impulsos de grande intensidade e quando associada a fibras polimodal há indício de sua participação como mediadores na resposta após danos teciduais.

Os nociceptores fibra C são incitados após serem acionados os receptores vaniloides estritamente aos receptores do tipo VR-1, que são acionados em uma temperatura de 43°C, bem como os do tipo VRL-1, que iniciam sua atuação aos 52 °C, sendo esses últimos os motivadores da reação em virtude do aumento da temperatura (JULIUS e BASBAUM, 2001; SILVA et al, 2013).

Outra possibilidade de ação do extrato etanólico bruto da espécie *C. torelliana* no teste em questão é a atuação da fibra A-Delta do tipo II que segundo Millan (1999), possui receptores mecanotérmicos para elevadas temperaturas (45-53 °C), temperatura esta utilizada no teste em questão, sendo possível que o extrato esteja atuando por mais de uma via.

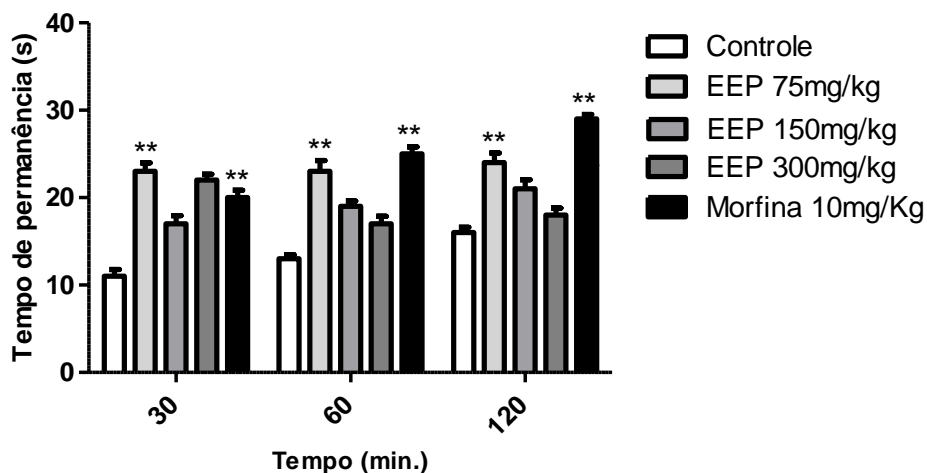


Gráfico 12: Efeito do EEP de *C. torelliana* sobre o tempo de latência dos camundongos expostos à placa quente. (n= 5 animais; ANOVA-seguido de Tukey).

5.2.7 Teste do Edema de Pata Induzido por Carragenina

A carragenina é um agente que promove o processo inflamatório, através do desbloqueio de prostaglandinas, promovendo a produção de edema. A biossíntese de prostaglandina pode ser diminuída através do bloqueio da cicloxigenase, efeito este atribuído

a anti-inflamatórios não-esteroidais como a indometacina (FARSAM et al., 2000; SOUZA et al., 2007).

O extrato de *C. torelliana* demonstrou diferença significativa em relação aos controles utilizados em todas as doses administradas (75, 150, 300 mg/kg), inibindo significativamente o edema das patas dos camundongos no tempo de 180 min (3 horas de experimento), reduzindo em 68%, 67% e 59% de forma respectiva para as doses mencionadas. O padrão utilizado (indometacina) inibiu o edema em 91%. Não foram encontradas diferenças significativas entre as doses utilizadas e o padrão nesse tempo. Vale ressaltar que os resultados encontrados confirmam a potencialidade anti-inflamatória, presumida através dos resultados adquiridos na segunda fase do teste da formalina.

Esses resultados se demonstraram mais relevantes do que os dados apresentados por Basting et al. (2014), que ao analisarem extratos de folhas de *Eugenia punicifolia* (Myrtaceae), verificaram uma eficiência de 50% na única dose administrada para o teste (250 mg/kg).

Indicativos de uma atuação anti- secretora e gastro-protetora para essa espécie *E. torelliana* já haviam sido mencionados por Adeniyi et al. (2006). Ao estudar o extrato bruto da folha dessa espécie, os autores sugerem o impedimento do processo inflamatório crônico gerado por úlceras e feridas, quando utilizado o extrato da mesma.

Essa atividade anti-inflamatória pode ser relacionada aos compostos fenólicos encontrados no extrato bruto etanólico do pólen da espécie analisada, relação esta já mencionada por Lima, L. A. et al. (2007), que relacionou o aumento da atividade anti-inflamatória com o acréscimo nos níveis de compostos fenólicos nas folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae), espécie pertencente a mesma família da espécie estudada.

Através dos dados encontrados, podemos sugerir que o EEP de *C. torelliana* pode estar possivelmente atuando sobre processos celulares a exemplo da inflamação por interferência de proteínas quinases a exemplo da p38 MAPK. Segundo Basting et al. (2014), as proteínas quinases encontram-se implicadas no bloqueio ou mesmo regulando a liberação de citocinas pró-inflamatória. Os mesmos autores ainda encontraram no mesmo estudo a inibição da fosforilação de p38a MAPK em todas as concentrações testadas para o extrato das folhas da espécie *Eugenia punicifolia*, chegando a uma inibição de até 90% em concentrações mais elevadas. Em outro estudo realizado por Meotti et al. (2007), foi descrita pelos autores a implicação da proteína p38 α MAPK na ação antinociceptiva da miricitrina em camundongos, assim como a presença deste flavonoide em planta do gênero *Eugenia* (Myrtaceae).

Kobuchi et al. (1999) e Vieira et al. (2014), estudando gengibre, atribuíram aos fenóis a aptidão de capturar e anular as espécies reativas de oxigênio, demonstrando dessa forma a propensão anti-inflamatória baseada na modulação de vias de sinalização celular imprescindíveis.

Os resultados obtidos no teste do edema de pata indicam mais uma possível atividade do extrato da espécie *C. torrelliana* (atividade anti-inflamatória), indicada no gráfico abaixo (gráfico 13). Foi observada uma diminuição pronunciada no edema das patas dos camundongos no tempo de 180 minutos, sugerindo uma possível ação periférica da substância empregada. Essa atuação pode indicar uma diminuição na produção de substâncias com ações semelhantes à prostaglandina. Embora haja indicação dessa atuação, são necessários estudos mais amplos que demonstrem as vias utilizadas pela substância, esclarecendo o mecanismo de ação utilizado por este.

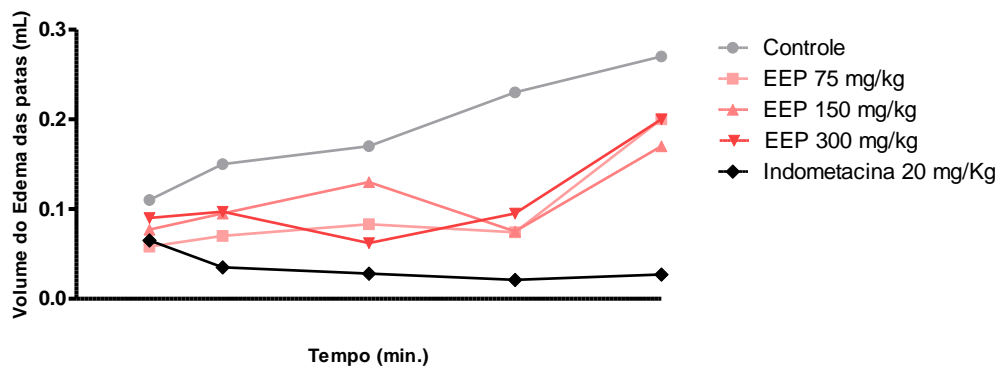


Gráfico 13: Efeito do EEP de *C. torrelliana* sobre a inibição dos edemas das patas dos camundongos induzido por carragenina. (n= 5 animais; ANOVA seguido Two- way).

6 CONCLUSÃO

- O teste de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) indicou a presença de terpenos, esteroides e compostos fenólicos no extrato etanólico bruto da espécie *C. torelliana*.
- O extrato etanólico bruto da espécie *C. torelliana* apresentou teor de compostos fenólicos e flavonoides em proporções superiores quando comparados a alguns dados descritos na literatura.
- O extrato da espécie *C. torelliana* possui ação antioxidante, mesmo demonstrando valores superiores aos controles utilizados. Esta atividade antioxidante verificada nos testes realizados pode ser atribuída a presença de compostos fenólicos encontrados na composição química do extrato da espécie *C. torelliana*.
- Em relação às análises biológicas, não foi demonstrado nenhuma toxicidade quando administrado o EEP na dose de 300 mg/kg em camundongos da espécie *Mus musculus*.
- O EEP de *C. torelliana* demonstrou uma possível atividade analgésica, a qual foi indicada pela considerável redução nas porcentagens de inibição da nocicepção nos testes realizados nesse experimento.
- O extrato de *C. torelliana* demonstrou atividade anti-inflamatória, a qual foi confirmada através dos resultados obtidos no teste do edema de pata onde foi registrada uma redução significativa do edema nas patas dos camundongos da espécie *Mus musculus*.
- Foi demonstrada uma melhor atividade do EEP na dosagem de 75 mg/kg (menor dosagem administrada), o que pode ser justificado por uma atuação mais específica da dose, sobre os receptores, intensificando a atuação da dose em questão, além disso, esse fator se torna relevante quando analisado o critério aquisição do material polínico e produção do EEP.
- Os estudos apontam uma possível atividade periférica e central para o EEP quando analisado os efeitos encontrados nos testes biológicos realizados, o que precisa ser melhor estudado no futuro.
- Sendo assim, pode se inferir que a espécie *Corymbia torelliana* tem um bom potencial antioxidante, analgésico e anti-inflamatório, dados estes que devem ser ampliados em estudos posteriores, com a identificação das substâncias presentes no extrato e determinação do mecanismo de ação.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; JANEWA C. A. JR. Immunology: improving on nature in the twenty-first century. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 129-138, 2000.
- ADENIYI, B. A.; ODUFOWOKE, R. O.; OLALEYE, S. B. Antibacterial and gastroprotective properties of *Eucalyptus torelliana* [Myrtaceae] crude extracts. **International Journal of Pharmacology**, v. 2, n. 3, p. 362-365, 2006.
- ALMEIDA, M. R. **Estudo farmacológico do extrato aquoso bruto e do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC.** 2014. 84 f. Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais da Amazônia) – Universidade Federal do Oeste do Pará, 2014.
- ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos.** 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ALVARENDA, F. Q. et al. Atividade antinociceptiva e antimicrobiana da casca do caule de *Psidium Cattleianum* Sabine. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 17, n. 4, p. 1125-1133, 2015.
- ALVES, M. L. T. M. F. Pólen – alimento e grande fonte de renda para o apicultor. **Pesquisa & Tecnologia**, v. 10, n. 2, p. 1-6, 2013.
- ANDRADE, P. B. et al. Physicochemical attributes and pollen spectrum of Portuguese heather honeys. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 503-510, 1999.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 01, p. 1-9, 2007.
- ARAÚJO, F. Y. R. Avaliação dos possíveis efeitos antipsicóticos da *Alpinia zerumbet* em camundongos. 2011. 116 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, 2011.
- ARAÚJO, J. L. O. et al. Síndromes de polinização ocorrentes em uma área de Mata Atlântica, Paraíba, Brasil. **Revista Biotemas**, v. 22, n. 4, p. 83-94, 2009.
- BANOV, D. et al. Caracterização do extrato seco de *Ginkgo biloba* L. em formulação de uso tópico. **Acta Farmaceutica Bonaerense** v. 25, n. 2, p. 219-24, 2006.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil.** Viçosa: Ed. Imprensa Universitária UFV, v. 2, 1991.
- BASTING, R. T. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and gastroprotective effects of a hydroalcoholic extract from the leaves of *Eugenia puniceifolia* (Kunth) DC. in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 257-267, 2014.
- BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 18, n. 2, p. 433-441, 2016.
- BERNARDI, A. **Nanocápsulas contendo Indometacina: avaliação dos efeitos antitumoral, neuroprotetor e anti-inflamatório.** 2009. 180 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas: Bioquímica) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009.

- BOGDANOV, S. Quality and standards of pollen and beeswax. **Apiacta**, v. 38, p. 334-341, 2004.
- BRASIL. **Ministério da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. 1. ed. Serie C. Projetos, Programas e Relatórios. Brasília - DF. 2009.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- CALIXTO, J. B. et al. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v. 87, n. 1, p.1-5, 2000.
- CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 131-134, 2005.
- CARNEVALLI, D. B.; ARAÚJO, A. P. S. Atividade biológica da pimenta preta (*Piper nigrum* L.): revisão de literatura. **Uniciências**, v. 17, n. 1, p. 41-46, 2013.
- CARPES, S. T. **Estudo das características físico-químicas e biológicas do pólen apícola de *Apis mellifera* L. da região Sul do Brasil**. 2008. 255 f. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.
- CARPES, S. T. et al. Study of preparations of bee pollen extracts, antioxidant and antibacterial activity. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 31, n. 6, p. 1818-1825, 2007.
- CARPES, S. T. Avaliação do Potencial Antioxidante do Pólen Apícola Produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.
- CASTAGNINO, G. L. B. **Efeito do fornecimento de substituto de pólen na redução da mortalidade de *Apis mellifera* L. causada pela cria ensacada brasileira**. 2002. 75 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2002.
- CASTRO, R. A. **Avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório do composto pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP**. 2011. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2011.
- CAZARIN, K. C. C. et al. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, p. 1-11, 2004.
- CECÍLIA, F. V. S.; MURGAS, L. D. S. Métodos de avaliação laboratorial da atividade antinoceceptiva e anti-flamatória de produtos naturais. **Boletim Técnico**: Universidade Federal de Lavras, n. 97, p. 1-35, 2014.
- COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.
- COPENER. **Resumo Público do Manejo Florestal**. Unidade de manejo florestal BSC S. A. e COPENAR FLORESTAL LTDA. Versão 1/abril 2014.
- DAGLIA, M. et al. In vitro antioxidant and ex vivo protective activities of green and roasted coffee. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1449-1454, 2000.

DEDRAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

DIAS, M. L. **Atividade antinociceptiva da riparina IV: participação dos receptores trpv1, trpm8, receptores glutamatérgicos e do óxido nítrico**. 2012, 82 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.

DUNSTAN, C.A. et al. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear oedema assays. **Journal of Ethnofarmacology**, v. 57, n. 1, p. 35-56, 1997.

ECOBICHON, D. J. **The basis of toxicity testing**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 1997.

EUN-MI CHOI, E. M. Antinociceptive and antiinflammatory activities of Pine (*Pinus densiflora*) pollen extract. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 5, p. 471-475, 2007.

FEIN, A. **Nociceptores: as células que sentem dor**. Tradução Paulo Petrov et al. Ribeirão Preto: Dor On Line, 2011.

FIUZA, T. S. et al. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 5, n. 2, p. 01-11, 2008.

FARSAN, M. A. **O uso indiscriminado de Benzodiazepínicos: uma análise crítica das práticas de prescrição, dispensação e uso prolongado**. 2010. 26 f. Trabalho de conclusão de curso (Especialização em Atenção Básica em Saúde da Família) – Universidade Federal de Minas Gerais, 2010.

FERREIRA, M. G. et. al. Pólen coletado por *Scaptotrigona depilis* (Moure) (Hymenoptera, Meliponini), na região de Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 54, n. 2, 2010.

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

FREE, M. M. Cross cultural conceptions of pain and pain control. **Baylor University Medical Center**, v. 15, n. 2, p. 143-145, 2002.

FREIRE, M. J. et. al. Quantificação de compostos fenólicos e ácido ascórbico em frutos e polpas congeladas de acerola, caju, goiaba e morango. **Ciência rural**, v. 43, n. 12, 2013.

GASPARINO, E. C.; CRUZ-BARROS, M. A. V. **Palinologia**. São Paulo: Instituto de Botânica, 2006. Disponível em: <http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Palinologia_Eduardo_Gasparino.pdf>. Acesso em: 28 abr. 2016.

GHIRALDINI, M. A. **Curso: Animais de experimentação**. São Paulo, 1995.

GILMAN, A. G.; GOODMAN, L. S.; RALL, T. W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11. ed.. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.

- GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 29, n. 4, p. 509-530, 2006.
- HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v.13, n. 10, p. 572-584, 2002.
- HILL, K. D.; JOHNSON, L. A. S. Systematic studies in the eucalypts 7: a revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae). **Telopea**, v. 6, n. 2-3, p. 185-504, 1995.
- HOSSEINZADEH, H.; KHOSHDEL, M.; GHORBANI, M. Antinociceptive, anti inflammatory effects and acute Toxicity of aqueous and ethanolic extracts of *Myrtus communis* L. Aerial parts in mice. **Journal of Acupuncture and Meridian Studies**. v. 4, n. 4, p. 242-247, 2011.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.
- JAHN, A. L.; GÜNZEL, P. K. H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment?. **Reproductive Toxicology**, v. 11, n. 2-3, p. 171-178, 1997.
- JULIUS, D.; BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.
- JUNIPER, B. E.; JEFFREE, C. E. **Plant Surfaces**. London: Edward Arnold, 1983.
- KOBUCHI, H.; VIRGILI, F.; PACKER, L. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. **Methods in Enzymology**, v. 301, p. 504-513, 1999.
- KOO, H.M.; SUHAILA, M. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **J. Agric. Food Chemistry**, v. 49, n. 6, p. 3106-3112, 2001.
- LAHLOU, M. Methods to study the phytochemistry and bioactivity of essential oils. **Phytotherapy Research**, v. 18, n. 6, p. 435-448, 2004.
- LAWAL, T. O. et al. Combination studies of *Eucalyptus torelliana* F. Muell leaf extracts and Clarithromycin on *Helicobacter pylori*. **Phytotherapy Research**, v. 26, p. 1393-1398, 2012.
- LEÃO, E. R. et al. Pesquisa em dor: análise bibliométrica de publicações científicas de uma Instituição de Pesquisa do Brasil. **Revista Dor**, v. 14, n. 2, p. 94-99, 2013.
- LEE, S. J. et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, n. 1, p. 131-137, 2005.
- LEES, P. et al. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in species of veterinary interest. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v.27, n. 6, p. 479-490, 2004.

LEFFLER, A.; MONTER, B.; KOLTZENBURG, M. The role of the capsaicin receptor TRPV1 and acid-sensing ion channels (ASICs) in proton sensitivity of subpopulations of primary nociceptive neurons in rats and mice. **Neuroscience**, v. 139, n. 2, p. 699-709, 2006.

LEITE, F. C. **Avaliação da atividade anti-Inflamatória e antinociceptiva do alcaloide Curina em modelos experimentais de inflamação aguda e nocicepção**. 2012. 122 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, 2012.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. 2008. 182 f. Tese (Doutorado em Ciências dos Alimentos) – Faculdade de Ciência Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2008.

LIMA, A. P. **Análise bioquímica e histológica da toxicidade do *Symphytum officinale* fitoterápico e homeopático em fígado e rins de ratos**. 2009. 132 f. Dissertação (Mestrado em Biopatologia bucal) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 2009.

LIMA, L. A. et al. Correlation of anti-inflammatory activity with phenolic content in the leaves of *Syzygium cumini* (L.) Skeels (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 30, n. 4, 2007.

LIMA, R. R. et al. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-34, 2007.

LINHARES, M. B. M. L.; DOCA, F. N. P. Dor em neonatos e crianças: avaliação e intervenções não farmacológicas. **Temas Psicologia** v. 18, n. 2, p. 307-325, 2010.

LOPES, J. R. G. et al. Administração de diferentes concentrações de folhas de *Ipomoea asarifolia* na ração de camundongos. **Ciência Rural**, v. 44, n. 5, p. 872-877, 2014.

LORENZI, H. et al. **Frutas brasileiras e exóticas cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2006.

LORENZI, H. et al. **Árvores exóticas no Brasil: madeireiras, ornamentais e aromáticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2003.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAGINA, M. A. et al. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MARCHIORI, J. N. C.; SOBRAL, M. **Dendrologia das Angiospermas – Myrtales**. Santa Maria: Editora da UFSM, 1997.

MATTEI, R.; FRANCA, C. I. F. Testes gerais para confirmar a ação central. In: ALMEIDA, R. N. **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 138-142.

MEKONNEN, T.; URGA, K.; ENGIDAWORD, E. Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* Jacq in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 433-439, 2009.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFRGS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MELO, R. R. et al. Características farmacobotânicas, químicas e biológicas de *Syzygium malaccense* (L.) Merr. & I. M. Perry. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 90, n. 4, p. 298-302, 2009.

MENDES, F. R.; MATTEI, R.; CARLINI, E. L. A. Activity of *Hypericum brasiliense* and *Hypericum cordatum* on the central nervous system in rodents. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 462-471, 2002.

MENEZES, J. D. S. et al. Compostos bioativos e potencial antioxidante do pólen apícola produzidas por abelhas africanizadas (*Apis mellifera* L.). **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 69, n. 2, p. 233-42, 2010.

MENEZES, J. D. S. **Compostos Bioativos do Pólen Apícola**. 2009. 63 f. Dissertação (Mestrado em Ciências de alimentos) – Universidade Federal da Bahia, 2009.

MENEZES, J. D. S. **Avaliação das práticas de colheita, beneficiamento e armazenamento do mel de *Apis mellifera* L., 1758 (Hymenoptera: Apidae) no Litoral Norte da Bahia, através de análises físico-químicas**. 2005. 56 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização em Segurança e Inspeção de Alimentos) – Universidade Federal da Bahia, 2005.

MEOTTI, F. C. Involvement of p38MAPK on the antinociceptive action of myricitrin in mice. **Biochemical pharmacology**, v. 74, n. 6, p. 924–931, 2007.

MERUSSE, J. L. B.; LAPICHICK, V. B. V. Instalações e equipamentos. In: LUCA, R. R. et al. (eds). **Manual para técnicos em bioterismo**. 2. ed. São Paulo: Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação animal, 1996. p. 15-25.

MIDDLETON, E. JR.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, n. 1, p. 1-164, 1999.

MINISTERIO DA SAÚDE. Portaria nº 3.916/MS/GM de 30 de outubro de 1998. Conselho Federal de Farmácia, Brasília, 1998.

MONSANTO, M. G. **Caracterização de compostos fenólicos e de minerais em alguns pólenes apícolas**. 2013. 92 f. Dissertação (Mestrado em Inovação e Qualidade na Produção Alimentar) – Instituto Politécnico de Castelo Branco, Escola Superior Agrária, Coimbra, 2013.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade?. **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.

- MOREIRA, A. V. B.; FILHO, J. M. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de tecidos de ratos. **Revista de Nutrição**, v. 17, n. 04, p. 411-424, 2004.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology**. In: VII Brazilian Meeting on Chemistry of Food and Beverages (BMCFB), Lorena, 2009.
- NSONDE NTANDOU, G. F. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Cassia siamea* Lam. stem bark extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 1, p.108-111, 2010.
- NUNES, F. P. B. **Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina**. 2012. 95 f. Tese (Doutorado em Ciências, Área Fisiologia Geral) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.
- NUNES, V. V. A. **Avaliação do efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* Cambess na dor aguda e na inflamação em modelos experimentais de roedores**. 2012. 79 f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) – Universidade Estadual Paulista, 2012.
- OECD. **Guideline for testing of chemicals 420**. Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, 2001.
- OYEDEJI, A. O. et al. Antimicrobial activity of the essential oils of Five *Eucalyptus* species growing in Nigeria. **Fitoterapia**, v.70, n. 5, p. 526-528, 1999.
- PAIVA, D. C. C. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da entrecasca de *Pseudobombax marginatum* (St. Hill) Rob. proveniente da caatinga potiguar**. 2013. 67 f. Dissertação (Mestrado em Ciências naturais) – Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, 2013.
- PARK, Y. K. et al. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 18, n.3, p. 313-318, 1998.
- PERES, M. T. L. P. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd & Fisch.) Copel (Polypodiaceae). **Química Nova**, v. 32, n.4, p. 897-901, 2009.
- PINTO, W. B. V. R.; KO, G. M. Teste De Rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. **Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório**, v. 1, n. 2, p. 202-212, 2012.
- PIORNEDO, R. R. **Atividade antiinflamatória de *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa* em camundongos**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná, 2010.
- PIZO, M. A. Padrão de deposição de sementes e sobrevivência de sementes e plântulas de duas espécies de Myrtaceae na Mata Atlântica. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 26, n. 3, 2003.

- PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT-Food Sci. Technol**, v. 40, p. 1-11, 2007.
- RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9-10, p.1231-1237, 1999.
- REIS, C. F.; ASSIS, T. F.; SANTOS, A. M. **Corymbia maculata: estado da arte de pesquisas no Brasil**. 1. ed. Colombo: Embrapa Florestas Colombo, 2014.
- RIVERA, E. A. B. Analgesia em animais de experimentação. In: ANDRADE, A; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. (Orgs). **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. p. 230-27.
- ROBERT, C. et al. Evolution of the scientific literature on pain from 1976 to 2007. **Pain Medicine**, v. 11, n. 5, p. 670-84, 2010.
- ROCHA e SILVA, M. Brief survey of the history of inflammation. 1978. **Agents and actions**, v. 43, n. 3-4, p. 86-90, 1994.
- ROCHA, J. F. M. **Avaliação do efeito do armazenamento na qualidade do pólen apícola**. 2013. 111 f. Dissertação (Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar) – Instituto Politécnico de Bragança, Escola Superior Agrária, 2013.
- RODRIGUES, H. G. et al. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista brasileira de plantas medicinais**, v. 13, n. 3, p. 359-366, 2011.
- ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.
- RUFINO M. S. M. et, al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico 127**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2007.
- RUSTAY, N. R.; WAHLSTEN, D.; CRABBE, J. C. Influence of task parameters on rotarod performance and sensitivity to ethanol in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 141, n. 2, p. 237-249, 2003.
- SÁ, P. G. S. et al. Fenóis totais, flavonoides totais e atividade antioxidante de *Selaginella convoluta* (Arn.) Spring (Selaginellaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 561-566, 2012.
- SABINO, A. S. **Benefícios da atividade do brincar durante procedimentos invasivos e dolorosos em crianças hospitalizadas**. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) – Universidade Federal do Amazonas, 2015.
- SANTOS, F. A. R. **Introdução à palinologia – manual didático**. Feira de Santana: Editora UEFS, 2006.
- SCHUMACHER, M. A. Transient receptor potential channel in pain and inflammation therapeutic opportunities. **Pain practice**, v. 10, n. 3, p. 185-200, 2010.
- SEGURA, T. E. S. **Avaliação das madeiras de *Corymbia citriodora*, *Corymbia torelliana* e seus híbridos visando à produção de celulose Kraft branqueada**. 2015. 199 f. Tese

(Doutorado em Ciências) – Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2015.

Serhan, C. N; Oliw E. Unorthodox routes to prostanoid formation: new twists in cyclooxygenase-initiated pathways. **J Clin Invest**, v. 107, n. 12, p. 1481-9, 2001.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347-352, 1989.

SILVA, A. C. O; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **Rev. Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SOUSA, F. C. F. et al. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: uma revisão da bioatividade e potenciais benéficos nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654, 2008.

SOUSA, O. V. et al. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, n. 1, p. 51-56, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal: Metabólitos Secundários e Defesa vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2011.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **JBA**, v.1, n.4, p. 329-334, 2001.

TEIXEIRA, M. J. **A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desferentação**. 1990. 256 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1990.

TÚRMINA, J. A. Avaliação da toxicidade subcrônica in vivo do exopolissacarídeo produzido pelo fungo *Lasiodiplodia theobromae* MMPI. 2012. 54 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual do Centro-Oeste, 2012.

TIWARI, P. et al. Phytochemical screening and Extraction: A Review. **Internationale Pharmaceutica Scientia**, v.1, n.1, p.98-106, 2011.

UENO, A. et al. Intrinsic prostacyclin contributes to exudation induced by bradykinin or carrageenin: a study on the paw edema induced in IP-receptor-deficient mice. **Life Science**, v. 66, n. 12, p. 155-160, 2000.

VALÉRIO, E. S. **Avaliação da atividade dos extratos hidroetanólico de *Chenopodium ambrosioides* L. e de *Eucalyptus alba* Reinw ex Blume, frente a cepas de *Mycobacterium* sp.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pará, 2014.

VAREDA, P. M. P. **Avaliação da atividade hipoglicemiante do extrato de *Myrcia bella* em camundongos diabéticos induzidos por estreptozotocina.** Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Universidade Estadual Paulista, 2013.

VIEIRA, N. A. et al. Efeito anti-inflamatório do gengibre e possível via de sinalização. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 35, n. 1, p. 149-162, 2014.

VILAS-BOAS, O. M. G. S. et al. **Farmacologia**. Afenas: Centro Universitário Federal, 2004.

VILLARREAL, L. P. S. et al. Compostos fenólicos e atividade antioxidante do pólen coletado pela abelha sem ferrão *Melipona seminigra* na região amazônica. In: 32^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. **Anais...** Fortaleza, 2009.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. New York: Springer Verlag, 2001.

WINER, B. J.; BROWN, D. R.; MICHELIS K. M. **Statistical principles in experimental design**. 3.ed. New York: McGraw Hill, 1991. p. 100-165.

WOISKY. R. G. **Método de controle químico de amostras de própolis**. 1996.74 f. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

ANEXO

ANEXO A

Parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa (Ceua) autorizando a pesquisa com cobaias.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA

Ofício: 01/32016

Feira de Santana, 11 de Março de 2016.

DE: Prof. Dr^a Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEFS

PARA: Profa. Dr^a. Angélica Maria Lucchese

Orientadora

Ilustríssima Professora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**Composição Química e Atividade Biológica do Extrato Bruto dos Grãos de Pólen da Espécie: *Eucalyptos torelliana* F. Muell. (Myrtaceae)**” da autoria de: Teresa Cristina Souza Rebouças sob sua coordenação e da equipe executora, registrado nesta comissão sob o número de Protocolo nº 010/2015 CEUA/UEFS e datado de 24 de agosto de 2015, e com entrada na CEUA/UEFS em 28/08/2015, foi analisado pelo parecerista, nomeado pelo CEUA/UEFS, o qual solicitou que a autora realizasse adequações do projeto, visto que o mesmo não apresentava as folhas numeradas. Após receber as devidas correções, em 10/03/2016, a cópia do projeto foi anexado ao processo e o parecerista foi de **PARECER FAVORÁVEL**, para que o projeto possa ser executado conforme cronograma apresentado. Segue em anexo transcrição do parecer.

Atenciosamente,


 Prof. Dr^a. Iraci Gomes Bonfim

Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais da UEFS

Portaria nº 878/2012

TRANSCRIÇÃO DO PARECER

ANÁLISE DO PROJETO

Processo registrado nesta comissão sob o número de Protocolo nº 010/2015, CEUA/UEFS e datado de 28/10/2015.

1- DO PROJETO

O projeto de pesquisa intitulado: “**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DO EXTRATO BRUTO DOS GRÃOS DE PÓLEN DA ESPÉCIE *Eucalyptus torelliana* F. Muell. (Myrtaceae)**”.

Autora: Teresa Cristina Souza Rebouças. Professora Dr^a. Angélica Maria Lucchese (Coordenadora responsável e Orientadora) e Professora Dr^a. Marilene Lopes da Rocha (colaboradora).

2- DA FOLHA ROSTO

Todos os itens que constam na folha rosto se encontram preenchidos adequadamente, bem como as assinaturas dos termos de compromisso e declarações dos responsáveis pelo experimento.

3. DOS OBJETIVOS E METODOLOGIA

Após leitura e análise do projeto, verifiquei que os objetivos e metodologias estão em consonância com as normas propostas pelo Comitê de Ética no Uso de animais da UEFS.

Os objetivos vão avaliar: (1) a composição química do extrato bruto de grão de pólen de *Eucalyptus torelliana* (uma planta da família Myrtaceae) e (2) o uso do extrato bruto de grão de pólen, avaliados em ensaios biológicos, para verificar seu potencial como: atividade toxicológica, analgésica e anti- inflamatória. Os testes serão realizados utilizando o modelo biológico, da espécie: *Mus musculus*, da linhagem: Swiss (camundongos).

A metodologia apresenta etapas bem delineadas e os métodos apresentados estão alicerçados em literatura atual e focados no tema.

Todas as etapas da pesquisa envolvendo animais serão desenvolvidas nas dependências do Biotério Central do DCBIO/UEFS, na sala de experimentação do biotério em ambiente com temperatura e luminosidade controlada, será utilizado um total de 221 animais camundongos machos, com 60 dias de nascidos.

4. DO PROTOCOLO

Os procedimentos experimentais estão bem detalhados no protocolo. A autora apresenta uma literatura consistente, quanto aos procedimentos para obtenção dos resultados, o que justifica o número de um total de 221 animais.

No item, referente à eutanásia, os animais após término dos experimentos, serão sacrificados por aprofundamento da anestesia cujas dosagens aplicadas são adequadas ao peso corpóreo de cada indivíduo e estão de acordo com a legislação.

O projeto possui suporte financeiro subsidiado pela UEFS, conforme consta na planilha de orçamento.

PARECER FINAL

Ao analisar o projeto verifiquei que a pesquisa tem mérito científico, esta em consonância com as normas ética no uso de animais na experimentação, obedecendo aos 3R, o que é razoável com a conduta da experimentação científica, os animais em uso terão tratamento e manutenção compatíveis com o esperado. A pesquisa vai contribuir para o aprofundamento do conhecimento do grão de pólen da espécie em estudo. Consideramos ser o projeto relevante, que o cronograma para execução do projeto é exequível e esta em consonância com as normas ética no uso de animais, conforme a Lei 11.794 e Normas do CONCEA sobre o uso de animais em experimentação, motivo pelo qual somos de **PARECER FAVORÁVEL**, para que o projeto possa ser executado conforme cronograma apresentado.