

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Ação terapêutica do extrato etanólico das folhas de
Platonia insignis Mart. na síndrome do desconforto
respiratório induzida em ratos**

MARIA LANNA SOUZA DA SILVA

ORIENTADOR: PROF. DR. ANTÔNIO LUIZ MARTINS MAIA FILHO

COORIENTADORA: PROF. DRA. VALDILÉIA TEIXEIRA UCHÔA

Teresina – PI
2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ

CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**Ação terapêutica do extrato etanólico das folhas de
Platonia insignis Mart. na síndrome do desconforto
respiratório induzida em ratos**

MARIA LANNA SOUZA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica.
Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho.

Teresina – PI

S586a Silva, Maria Lanna Souza da.
Ação terapêutica do extrato etanólico da folhas de *Platonia insignis* Mart.
na síndrome do desconforto respiratório induzida em ratos / Maria Lanna
Souza da Silva. - 2023.
51 f.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual do Piauí – UESPI,
Programa de Pós- Graduação em Química - PPGQ, Mestrado em Química,
Campus Poeta Torquato Neto, Teresina - PI, 2023.
“Área de concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica.”
“Orientador: Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho.”

1. *Platonia insignis* Mart. 2. *Platonia insignis* Mart. - Ação farmacológica.
3. Triagem fitoquímica. I. Título.

CDD: 540

Ação terapêutica do extrato etanólico das folhas de *Platonia insignis* Mart. na síndrome do desconforto respiratório induzida em ratos

MARIA LANNA SOUZA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Estadual do Piauí, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Química – Área de concentração: Síntese Orgânica e Bioprospecção Fitoquímica.

Aprovado em 24 de Janeiro de 2023.

Membros da Banca:



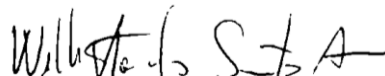
Prof. Dr. Antônio Luiz Martins Maia Filho
(Presidente da Banca – UESPI)



Prof(a). Dr(a). Valdiléia Teixeira Uchôa
(Co-orientadora - Membro Titular – UESPI)



Prof. Dr. Charllyton Luis Sena da Costa
(Membro Titular – UNINASSAU)



Prof. Dr. Wellington dos Santos Alves
(Membro Titular – UESPI)

Prof(a). Dr(a). Francielle Aline Martins
(Membro Suplente – UESPI)

Teresina – PI

2023

Dedicatória

Dedico esta, e outras conquistas, à minha Família.

AGRADECIMENTOS

- ❖ A Deus, por ter me sustentado até aqui e ter colocado as pessoas certas em meu caminho para a concretização desta conquista.
- ❖ A minha Família, por se alegrarem com minhas conquistas, por toda ajuda, apoio, incentivo, carinho e compreensão nos momentos difíceis.
- ❖ Ao meu chefe de setor Marcos Gonçalves, pela ajuda indireta, apoio e colaboração para que eu pudesse finalizar a minha pesquisa.
- ❖ Aos professores Dr. Antonio Luiz Martins Maia Filho e Dra. Valdíleia Teixeira Uchôa, pela orientação e coorientação, acolhimento e paciência. Por terem me guiado no melhor caminho durante a Pós-graduação e me compreenderem de forma empática em todos os momentos.
- ❖ Aos meus amigos do Grupo de Pesquisa em Produtos Naturais pela ajuda e parceria.
- ❖ Aos parceiros dos laboratórios GERATEC e as instituições parceiras UFPI, LPN e IFAL pelas contribuições na realização deste trabalho.
- ❖ A Universidade Estadual do Piauí, pela oportunidade de realização desta pesquisa.

Epígrafe

“Ensinar não é transferir conhecimento, mas criar possibilidades para a sua própria produção ou construção. Quem ensina aprende ao ensinar e quem aprende ensina ao aprender”

(Paulo Freire)

RESUMO

SILVA, M.L.S. Ação terapêutica do extrato etanólico das folhas de *Platonia insignis* Mart. na síndrome do desconforto respiratório induzida em ratos. 2023. 51 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Estadual do Piauí. Teresina.

A *Platonia insignis* Mart é popularmente conhecida como Bacuri. Todas as partes desta planta têm indicações de uso na medicina popular. A decocção das sementes, por exemplo, é usada para tratar a diarreia, enquanto o óleo das sementes é usado no tratamento de doenças de pele, otite, reumatismo, artrite e cicatrizante. Os objetivos deste trabalho foram prospectar o perfil químico da espécie *P. insignis* por meio de CG-EM e CLAE e investigar a ação farmacológica do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* na síndrome do desconforto respiratório agudo (SDRA) por isquemia e reperfusão intestinal em ratos. Para a indução da SDRA, 35 ratos machos foram distribuídos em sete grupos. O grupo controle negativo, foi submetido a isquemia e reperfusão mas não foi tratado. Os grupos E, F e G foram submetidos a tratamento com a aplicação do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* liofilizado (500 mg/kg), bromidrato de fenoterol e associações por via inalatória. As alterações estruturais e inflamatórias pulmonares foram avaliadas através do exame histológico. Na triagem fitoquímica preliminar observou-se que o extrato das folhas apresentou resultado positivo para, alcaloides, saponinas e triterpenos. Na análise por CG-EM verificou que o extrato etanólico das folhas de *P. insignis* apresentaram 60 compostos. Os compostos majoritários identificados no extrato etanólico das folhas de *P. insignis* foram fitol (10,54%), gama – sitosterol (9,88%) e ácido hexadecanóico (9,84%). Já na análise por CLAE revelou no extrato em estudo o metabólito secundário catequina. Por fim, o extrato foi capaz de estagnar a dilatação acentuada dos bronquíolos terminais e respiratórios e dos alvéolos. Os resultados mostraram que o extrato etanólico das folhas de *P. insignis* apresenta-se como uma nova opção de abordagem terapêutica no tratamento da SDRA.

Palavras-chave: Abordagem terapêutica; Catequina; *Platonia insignis* Mart.; Triagem fitoquímica.

ABSTRACT

Platonia insignis Mart is popularly known as Bacuri. All parts of this plant have indications for use in folk medicine. The decoction of the seeds, for example, is used to treat diarrhea, while the oil from the seeds is used to treat skin diseases, otitis, rheumatism, arthritis, and cicatrizing. The objectives of this work were to prospect the chemical profile of *P. insignis* by means of GC-MS and CLAE and to investigate the pharmacological action of the ethanolic extract of *P. insignis* leaves on acute respiratory distress syndrome (ARDS) by intestinal ischemia and reperfusion in rats. For the induction of ARDS, 35 male rats were distributed in seven groups. The negative control group was submitted to ischemia and reperfusion but was not treated. Groups E, F and G were treated with ethanolic extract of *P. insignis* leaves freeze-dried (500 mg/kg), fenoterol bromide and associations by inhalation. Structural and inflammatory pulmonary changes were evaluated by histological examination. In the preliminary phytochemical screening it was observed that the leaf extract was positive for alkaloids, saponins and triterpenes. The GC-MS analysis verified that the ethanolic extract of *P. insignis* leaves showed 60 compounds. The major compounds identified in the ethanolic extract of *P. insignis* leaves were phytol (10.54%), gamma-sitosterol (9.88%) and hexadecanoic acid (9.84%). Already in the analysis by CLAE revealed in the extract under study the secondary metabolite catechin. Finally, the extract was able to stagnate the marked dilatation of terminal and respiratory bronchioles and alveoli. The results showed that the ethanolic extract of *P. insignis* leaves presents itself as a new option of therapeutic approach in the treatment of ARDS.

Keywords: Therapeutic approach; Catechin; *Platonia insignis*; Phytochemical screening.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Estrutura do SARS-CoV-2; M: membrana lipídica; S: espícula de contato do vírus com receptores celulares; E: envoltório glicoproteico; RNA⁺: material genético viral; N: capsídeo proteico;

Figura 3.1: Laparotomia e oclusão da artéria mesentérica superior com o auxílio de um *cluster*;

Figura 3.2: Terapêutica realizada com nebulização - associação de extrato liofilizado de *P. insignis* e bromidrato de fenoterol;

Figura 3.3: Exposição da traqueia através da incisão longitudinal na região cervico-ventral;

Figura 4.1: Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* (curva rosa) e dos padrões cromatográficos (curva em preto) de ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), epicatequina (4), seringaldeído (5), ácido cumárico (6) e ácido salicílico (7) em 290 nm.

Figura 4.2: Análise estatística do número de células inflamatórias do LBA dos pulmões dos animais tratados com extrato etanólico das folhas de *P. insignis* e bromidrato de fenoterol ***= $p < 0,001$ comparado ao grupo IR e IR/V. ANOVA seguida de Tukey.

Figura 4.3: Fotomicrografias de histologia do pulmão. A) Não manipulado. B) Aberto, não manipulado. C) Isquemia, não tratado. D) Isquemia, tratado com veículo. E) Isquemia, tratado com extrato. F) Isquemia, tratado com bromidrato de fenoterol. G) Isquemia, tratado com bromidrato de fenoterol + extrato; * árvore brônquica – bronquíolos terminais.

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1: Divisão dos animais em grupos experimentais.

Tabela 4.1: Composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *P. insignis*. por análise em CG-EM com seus respectivos: tempos de retenção (T_R min), compostos, fórmulas e massas moleculares e percentuais relativos de área (%).

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

SDRA – Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo;

LPA – Lesão Pulmonar Aguda;

CG-EM – Cromatografia Gasosa Acoplada à Espectrometria de Massas;

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência;

EEF – Extrato Etanólico das Folhas;

RNA – Ácido ribonucleico;

SARA – Síndrome da Angústia Respiratória Aguda;

MEC – Matriz Extracelular;

I-r – Isquemia e Reperfusão Intestinal;

AMS – Artéria Mesentérica Superior;

SISGEN – Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado;

UFPI – Universidade Federal do Piauí;

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;

UESPI – Universidade Estadual do Piauí;

NPBio – Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade;

IFAL – Instituto Federal de Alagoas;

tR – Tempo de Retenção;

LBA – Lavado Broncoalveolar;

HE – Hematoxilina / Eosina;

NADPH OXIDASE – Nicotinamina Adenina Denucleotídeo Fosfato Oxidase;

ATP – Adenosina Trifosfato;

AMPc – Adenosina Monofosfato Cíclico;

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO.....	13
1.1 Objetivos	15
1.4.1 Gerais	15
1.4.2 Específicos	15
CAPÍTULO 2 – REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1 COVID – 19:Surgimento, Transmissão e Sintomas	16
2.2 Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo	18
2.3. Isquemia e Reperfusão Intestinal (I-R)	16
2.4 Plantas Medicinais	17
2.5 <i>Platonia insignis</i> Mart - Bacuri	17
CAPÍTULO 3 – METODOLOGIA EXPERIMENTAL	21
3.1 Coleta do material vegetal	22
3.2 Preparação do extrato	22
3.3 Animais.....	22
3.4 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	23
3.5 Análise por CG-EM do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	23
3.6 Análise por CLAE do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	24
3.7 Protocolo experimental.....	25
3.7.1 Indução da resposta inflamatória pulmonar – isquemia e reperfusão ...	25
3.7.2 Tratamento	26
3.7.3 Lavado broncoalveolar	26
3.7.4 Contagem de células totais	27
3.7.5 Eutanásia	27
3.7.6 Análise histológica do pulmão	27
3.7.7 Análise estatística.....	28
CAPÍTULO 4 – RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	29
4.1 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	29
4.2 Análise por CG-EM do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	29

4.3 Análise por CLAE do extrato etanólico das folhas de <i>P. insignis</i>	38
4.4 Análise histológica do pulmão	39
CAPÍTULO 5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	44
CAPÍTULO 6 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

Capítulo 1

INTRODUÇÃO

Uma das principais causas de mortalidade para os seres humanos são as doenças respiratórias, e grande parte dessas infecções são causadas por vírus. Entre os vários vírus destacam-se o SARS-CoV-2 pertencente à família *Coronaviridae* [1].

O Coronavírus na Síndrome Respiratória Aguda Grave (SARS-CoV-2), causa pneumonia grave e insuficiência pulmonar aguda. Alguns indivíduos com pneumonia desenvolveram SDRA e em alguns deles, a situação se agravou em um curto período de tempo [2]. Os idosos e aqueles que apresentam comorbidades como hipertensão, diabetes e doenças cardiovasculares tendem a desenvolver a SDRA mais rápido, chegando a óbito [3].

A SDRA é definida como uma inflamação da membrana alvéolo-capilar, e está relacionada a alguns fatores de risco que podem desencadear uma lesão pulmonar através de mecanismos diretos, como aspiração de conteúdo gástrico, pneumonia, lesão inalatória, contusão pulmonar; ou de forma indireta, como sepse, traumatismo, pancreatite [4].

A lesão por esta síndrome pode ser induzida por isquemia e reperfusão. A isquemia é uma condição em que o fluxo sanguíneo, rico em oxigênio, é interrompido a determinado órgão ou tecido, prejudicando sua oxigenação celular [5].

A reperfusão é um termo utilizado para definir o restabelecimento do fluxo sanguíneo e, portanto, do oxigênio, ao tecido que se encontrava em isquemia. Em diversos tecidos, as consequências da isquemia dependem de sua duração e muitas lesões são desenvolvidas durante o estágio de reoxigenação. Contudo a recuperação da reoxigenação tecidual tem a capacidade de dar início a reações bioquímicas deletérias que contribuem para danos teciduais tardios [6].

Com o surgimento do SARS-CoV-2 causador da Covid-19, houve um amplo acréscimo na busca de terapias alternativas que pudessem prevenir e até mesmo tratar a doença [7].

Diante disso, busca-se a melhor forma de reabilitar as funções pulmonares de pacientes com lesão pulmonar aguda e síndrome do desconforto respiratório agudo, por meio do uso de fitoterápicos, que consiste na utilização terapêutica de plantas medicinais desencadeando a modulação de processos fisiológicos de maneira segura e efetiva [8].

Entre várias espécies vegetais de interesse mundial, encontra-se *Platonia insignis*, sendo popularmente conhecida como Bacuri, pertencente à família Clusiaceae. É encontrado nas regiões do Paraguai ao Suriname e é amplamente distribuído nos biomas da Amazônia e Cerrado [9].

O interesse crescente pelo uso de *P. insignis* está relacionado com as diversas propriedades farmacológicas presentes nessa espécie desde a sua forma como extrato até o composto isolado de diversas partes da planta. Vários estudos relatam que as frações voláteis de *P. insignis* e os extratos polares de suas sementes são ricos em atividades antioxidantes, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antiparasitários e imunorreguladores [9,10]. Além disso, os terpenos e compostos fenólicos se destacam como seus principais compostos bioativos [10].

O presente trabalho teve como objetivo prospectar, por meio de CG-EM e CLAE, o perfil químico da espécie *P. insignis* e investigar a ação farmacológica do EEF de *P. insignis* na síndrome do desconforto respiratório agudo induzida por isquemia e reperfusão intestinal em ratos.

1.1 Objetivos

1.1.1 Objetivo Geral

Prospectar, por meio de CG-EM e CLAE, o perfil químico preliminar da espécie *P. insignis* e investigar a ação farmacológica do EEF de *P. insignis* na síndrome do desconforto respiratório agudo induzida por isquemia e reperfusão intestinal em ratos.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Realizar a triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*;
- Identificar por métodos cromatográficos os compostos fitoquímicos correlacionando com atividade biológica do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*;
- Verificar o potencial anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* sobre a inflamação pulmonar aguda induzida por isquemia e reperfusão intestinal em ratos;

Capítulo 2

REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 COVID-19: Surgimento, transmissão e sintomas

O SARS-CoV-2 representa picos em forma de coroa na superfície externa do vírus. É um vírus de ácido ribonucleico (RNA), cujo material genético é representado por uma molécula de RNA positivo (RNA⁺), na qual este pode ser analisado diretamente pelas estruturas celulares. São identificadas cerca de 29 diferentes proteínas virais, nas quais as mais relevantes são a glicoproteína de pico, chamada de proteína S, e o nucleocapsídeo viral chamada de proteína N [12]. A estrutura do SARS-CoV-2 é ilustrado na Figura 1.

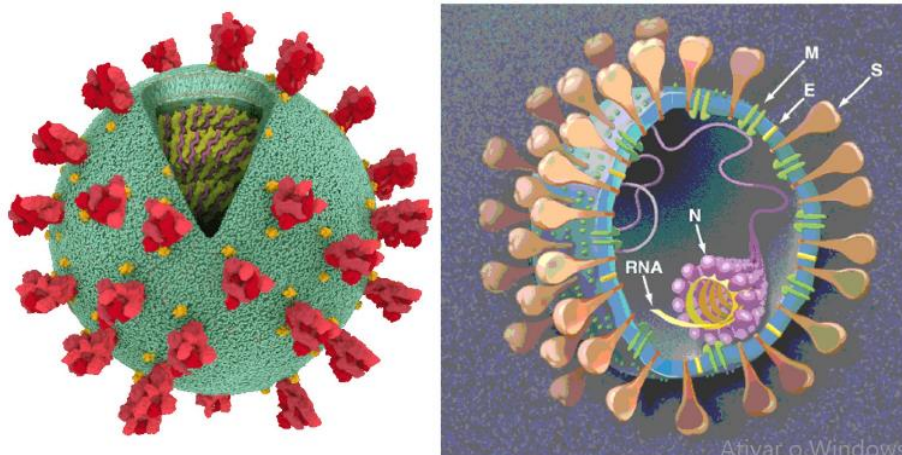


Figura 2.1. Estrutura do SARS-CoV-2; M: membrana lipídica; S: espícula de contato do vírus com receptores celulares; E: envoltório glicoproteico; RNA⁺: material genético viral; N: capsídeo proteico [12].

A proteína S permite a entrada do vírus na célula hospedeira, pela ligação ao receptor celular e à fusão da membrana. Já a proteína N regula o processo de replicação viral [12].

Pensava-se que esse vírus infectasse apenas animais, até que o mundo testemunhou um Surto Grave de Síndrome Respiratória Aguda (SARS) causada pelo SARS-CoV, na China no ano de 2002 em Guangdong [13].

Estudos tem demonstrado cada vez mais a transmissão de SARS-CoV-2 de humanos para humanos através de gotículas ou pele de contato [14]. Com base nos resultados de investigações genômicas e na presença de alguns morcegos, o SARS-CoV-2 pode ter sido originado de morcegos associado a materiais contaminados no mercado ou na região ao redor [15].

Os sintomas da Covid-19 são diversos, podendo variar do estado assintomático à disfunção múltipla dos órgãos. Os sintomas clínicos mais comuns são febre (87,9%), tosse (67,7%), fadiga (38,1%), enquanto diarreia (3,7%) e vômito (5%) apresentam de forma rara. A maioria dos pacientes apresentou um grau de dispneia, porque o tempo entre o início dos sintomas e o desenvolvimento da SDRA foi de apenas 9 dias entre os pacientes iniciais com infecção por Covid-19 [16].

Até hoje, ainda não há um método terapêutico de qualidade, que possibilite a utilização de uma terapia farmacológica específica, para pacientes com Covid-19. De acordo com os resultados adversos da atual pandemia, é necessário o estudo e o desenvolvimento de estratégias terapêuticas, para lidar com a falta de medicamentos seguros e eficazes bem como a alta taxa de mortalidade [3].

2.2 Síndrome do desconforto respiratório agudo – SDRA

A Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo – SDRA ou Síndrome da Angústia Respiratória Aguda (SARA) trata-se de uma insuficiência respiratória aguda, com rápida evolução sintomática, e uma lesão pulmonar aguda em seu estágio mais grave, ocasionando um dano alveolar difuso, sendo esta a característica histológica mais importante [17,18].

O desenvolvimento da SDRA ocorre a partir do aumento da permeabilidade da membrana alveolar capilar pulmonar, gerando quadros de hipoxemia e opacidade pulmonar bilateral difusa [19].

Dessa forma, entende-se, que a SDRA não é uma doença específica, mas sim a agressão da barreira alvéolo-capilar por um ou mais fatores etiológicos ou casuais, graves e com características inflamatórias, que podem ser de origem pulmonar ou extrapulmonar, constituindo os chamados fatores de risco para a SDRA. O conhecimento desses fatores de risco pode contribuir para o diagnóstico precoce da síndrome e, dessa forma, para a instituição de medidas terapêuticas pertinentes [20].

Na SDRA pulmonar, o epitélio alveolar é a primeira estrutura lesada. A lesão à barreira epitelial acarreta: edema alveolar, redução da depuração do edema, diminuição da produção de surfactantes e fibrose. O reparo epitelial alveolar eficiente pode minimizar a formação da fibrose, pois a camada epitelial intacta suprime a proliferação de fibroblasto e deposição de matriz extracelular (MEC) [20].

Já na SDRA extrapulmonar, a célula endotelial é primariamente lesada por mediadores inflamatórios circulantes liberados do foco extrapulmonar, como, por exemplo, peritonite e pancreatite. O endotélio pulmonar é um tecido altamente especializado que possui funções fisiológicas, imunológicas e de síntese, além de armazenar inúmeras enzimas, receptores e moléculas de transdução, que interagem umas com as outras e com os constituintes da parede do capilar e células sanguíneas circulantes [20].

A lesão inflamatória ao endotélio microvascular e ao epitélio alveolar inicia-se com o desequilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios. Neutrófilos, macrófagos, células endoteliais, células epiteliais alveolares e fibroblastos tem papel fundamental na inicialização, mediação e supressão do processo inflamatório. Várias citocinas são liberadas atuando na ativação dos neutrófilos e produção da MEC por fibroblastos [21].

2.3 Isquemia e reperfusão intestinal (I-r)

Isquemia é definida como uma interrupção no suprimento de oxigênio e nutrientes em uma determinada área durante um período, devido a uma deficiência no fornecimento do sangue, o que pode acarretar a morte tecidual. Durante a isquemia intestinal, ocorre a lesão na mucosa intestinal, aumento da permeabilidade microvascular, perda de fluído na luz intestinal, liberação de fator de depressão do miocárdio na circulação e choque circulatório, criando um ciclo vicioso, na qual essas alterações causam depressão na função cardíaca e esta, por sua vez, provoca progressiva deterioração da perfusão intestinal [22].

Durante o processo isquêmico com inadequado suprimento de oxigênio e comprometimento da fosforilação oxidativa na mitocôndria, ocorre acúmulo de metabólitos que diretamente ou através de mediadores químicos, podem causar lesão celular. Além disso, dependendo do tempo e intensidade da isquemia, quando o oxigênio é reintroduzido aos tecidos, a lesão pode ser ainda mais exacerbada [23].

A obstrução do fluxo da artéria mesentérica superior (AMS) está entre os eventos isquêmicos intestinais com maior capacidade lesiva para o organismo, com índices de mortalidade de 60 – 80% [26]. Isto porque a AMS em humanos é responsável pelo suprimento de sangue para áreas como: pâncreas, intestino delgado e cólon. Uma vez instalado, o quadro isquêmico na região mesentérica desencadeia diversas alterações metabólicas, as quais resultam na redução de reservas energéticas, acúmulo de metabólitos tóxicos e necrose tecidual [25].

A reperfusão intestinal é uma situação em que o suprimento sanguíneo interrompido pela isquemia é restaurado. Acredita-se que produtos tóxicos gerados durante a isquemia sejam removidos e possam ao ter acesso à circulação, promover importantes alterações no estado funcional do organismo como um todo. De fato, as consequências da isquemia e reperfusão intestinal não são restritas ao intestino e envolvem a indução de lesão tecidual em órgãos distantes [27]. Diversos relatos indicam que indivíduos sob isquemia intestinal, quando submetidos a reperfusão, desenvolvem lesão pulmonar aguda, podendo o quadro evoluir para a SDRA [28].

2.4 Plantas medicinais

A utilização de plantas com propriedades medicinais é uma das formas mais antigas da prática medicinal, sendo utilizado para o tratamento, cura e prevenção de doenças [29].

As terapias naturais em uma abordagem integrativa, podem auxiliar no alívio dos principais sintomas, além de possuir rol de comprovação fundamentada cientificamente quanto ao potencial para o aumento da imunidade, dando suporte imunológico, auxiliando na prevenção de infecções, na resposta anti-inflamatória e redução da mortalidade [30].

Estudos indicam que 80 % da população mundial faz uso de algum tipo de planta em busca de alívio para sintomas ou dores, a utilização dá-se por ser de fácil acesso, baixo custo e por serem consideradas inofensivas por grande parte da população [31].

Porém, nem todas possuem validação científica, estando passíveis a causarem possíveis malefícios para aqueles que a usarem de maneira equivocada [32]. Contudo, para ter conhecimento dos malefícios ou benefícios que as plantas podem causar aos seus usuários é necessário que haja identificação dos seus

constituintes. Esse procedimento é denominado Avaliação Fitoquímica, desenvolvida pela química dos produtos naturais, com o intuito de analisar a estrutura química e as propriedades biológicas das plantas [33].

O estudo fitoquímico ainda é um dos métodos mais utilizados para analisar a composição química dos vegetais e o mais apontado na literatura. Por esta razão, a triagem fitoquímica é uma técnica útil para os estudos preliminares de metabólitos secundários pois determina quais os principais compostos químicos contêm cada espécie vegetal fundamentando o uso medicinal das plantas através da pesquisa de substâncias ou moléculas ativas [34].

2.5 *Platonia insignis* Mart. – Bacuri

Dentre as inúmeras espécies vegetais de interesse mundial, encontra-se *Platonia insignis*, sendo popularmente conhecida como Bacuri, pertencente a espécie sul-americana de Clusiaceae. É encontrado nas regiões do Paraguai ao Suriname e é amplamente distribuído nos biomas da Amazônia e Cerrado [8].

O interesse crescente pelo uso de *P. insignis* está relacionado com as diversas propriedades farmacológicas presentes nessa espécie. Vários estudos relatam que as frações voláteis de *P. insignis* e os extratos polares de suas sementes são ricos em atividades antioxidantes, anti-inflamatórios, anticonvulsivantes, antiparasitários e imunorreguladores [8,9]. Além disso, os terpenos e compostos fenólicos se destacam como seus principais compostos bioativos [10].

Os compostos fenólicos são de grande interesse para a indústria devido ao seu potencial antioxidante. As indústrias no ramo alimentício e cosméticos, utilizam como conservantes de alimentos e agentes ativos para cremes antienvhecimento para a pele. Além disso, são utilizados no tratamento de doenças decorrentes da ação dos radicais livres [35]. Cascas e sementes de frutas, que geralmente não são utilizados em processos industriais, podem ser fontes promissoras de substâncias fenólicas. No entanto, ainda são poucas as iniciativas para desenvolver processos para que as indústrias possam utilizar esses resíduos [36].

Capítulo 3

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

3.1 Coleta do material vegetal

Inicialmente, foi realizado o cadastro na plataforma do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado – SISGEN, sob o número ACB65D0. As folhas de *P. insignis* foram coletadas em 13 de Fevereiro de 2019, na cidade de Timon no Maranhão, Brasil, nas seguintes coordenadas (04° 50' 56,6" S 042° 05' 04,8" W). Uma exsicata foi depositada no Herbário Graziela Barroso – UFPI, sob o registro TEPB 31.718.

3.2 Preparação do extrato

As folhas (794 g) foram limpas por meio da água corrente, secas a temperatura ambiente e trituradas por moinho de facas. Em seguida, o material vegetal foi submetido a maceração com etanol (4 L) por 8 vezes, com intervalos de 48 horas. O solvente foi removido em evaporador rotatório sob pressão reduzida e liofilizado para a obtenção do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* (80 g).

3.3 Animais

O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA da Universidade Estadual do Piauí sob protocolo 0518/2020 – CEUA/UESPI. Foram utilizados 35 ratos da linhagem Wistar, machos com idade entre 12 a 16 semanas, pesando entre 250 a 300 g, cedidos pelo Biotério do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade (NPBio – UESPI). Os animais foram mantidos em sala climatizada e acondicionados em gaiolas plásticas sob temperatura constante de 23 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas. Água e ração foram fornecidas *ad libitum*. Os ratos foram divididos em 7 grupos experimentais descritos na Tabela 3.1.

Tabela 3.1: Divisão dos animais em grupos experimentais.

Grupo	Descrição
A – <i>naïve</i>	Não manipulado
B – <i>Sham</i>	Aberto mas não manipulado
C – Controle negativo	I-R mas não tratado
D	I-R e tratado com veículo: 10 mL de solução fisiológica 0,9 %
E	I-R e tratado com extrato liofilizado de <i>P. insignis</i> em dose de 500 mg/kg
F	I-R e tratado com associação de 1 mL de bromidrato de fenoterol (5 mg/mL) em 10 mL de solução fisiológica 0,9 %.
G	I-R e tratado com associação de extrato liofilizado de <i>P. insignis</i> em dose de 500 mg/kg e bromidrato de fenoterol (5 mg/mL)

Legenda: I-r Isquemia e reperfusão intestinal;

3.4 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

O extrato etanólico de *P. insignis* foi submetido a prospecção fitoquímica para identificação de flavonoides, taninos, saponinas, triterpenoides e alcalóides, segundo o protocolo descrito por [37], e os resultados obtidos fundamentam-se nas reações de precipitação, mudança de coloração e nas propriedades físico-químicas dos constituintes químicos que compõem a planta.

Alcalóides

Em 2 mL do extrato, alcalinizou-se com 15 gotas de hidróxido de sódio a 1 % (ou NH₄OH até pH 11), acrescentou-se 2 mL de água e adicionou-se 2 mL de clorofórmio. Foi desprezada a fração aquosa e acrescida na fração clorofórmica quinze gotas de ácido clorídrico a 1 %, em seguida foi extraída com 2 mL de água. A fração clorofórmica foi desprezada e os testes foram realizados com a fração aquosa ácida, onde se acrescentou três gotas do reagente de Mayer

(Cloreto de mercúrio + Iodeto de potássio) para a verificação da presença de alcalóides.

Resultado esperado: a formação de precipitado floculoso é indicativo da presença de alcalóides.

Esteróides e triterpenóides

Foi feito através da reação de Lieberman – Burchard (Anidrido acético + Ácido sulfúrico concentrado). Em 2 mL do extrato, foi adicionado 3 mL de clorofórmio, com 2 mL de anidrido acético, este foi suavemente agitado e acrescentado de forma cuidadosa 3 gotas de H_2SO_4 concentrado, onde agitou-se repetidamente observando se ocorreu aparecimento de coloração.

Resultado esperado: a formação de uma coloração azul evanescente seguida de verde permanente é indicativa da presença de esteroides livres. Já a formação de uma coloração parda até a vermelha indica a presença de triterpenóides pentacíclicos livres.

Flavonoides

Em 2 mL do extrato, adicionou-se alguns centigramas de fita de magnésio e 2 mL de HCl concentrado, feito através do teste de Shinoda, o término da reação é indicada pelo fim da efervescência.

Resultado esperado: o aparecimento da coloração vermelha variável de parda a vermelha indica a presença de flavonoides no extrato.

Saponinas

Em 2 mL do extrato, adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 5 mL de água destilada, filtrando-se logo após para um tubo de ensaio. Posteriormente, a solução foi agitada permanentemente por 3 minutos e observou-se a formação de espuma.

Resultado esperado: o aparecimento de uma espuma persistente e abundante (colarinho) indicará a presença de saponinas (heterosídeos saponínicos).

Taninos

Em um tubo de ensaio contendo 2 mL do extrato, adicionou-se 3 gotas de solução alcoólica de FeCl_3 a 5 % (5 g de ácido férrico em 100 mL de água) e agitou-se fortemente observando se houve qualquer variação de cor, onde foi realizado um teste em branco ($\text{H}_2\text{O} + \text{FeCl}_3$) para comparação dos resultados.

Resultado esperado: A coloração variável entre o azul e o vermelho indica a presença de fenóis, quando for negativo o teste branco. Precipitado de tonalidade azul indica a presença de taninos hidrolisáveis, e verde, a presença de taninos condensados.

3.5 Análise por GC-EM do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

O extrato etanólico das folhas de *P. insignis* foi submetido a análise em cromatógrafo a gás, acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu, modelo GC/MS-GCMS-QP2010CN Ultra, equipado com injetor split/splitless (250 °C), coluna cromatográfica capilar do tipo DB-1 (Agilent Technologies, Palo Alto, EUA), com fase estacionária composta de 100% dimetilpolissiloxano, 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,10 μm de espessura de filme. A programação de temperatura iniciou a 50 °C e permaneceu por 5 minutos, sendo elevada em seguida para 250 °C com taxa de crescimento de 5 °C/min, permanecendo por 35 minutos. A temperatura da câmara de ionização e da interface entre CG/EM foi 200 °C e 250 °C, respectivamente. Como gás de arraste foi usado o Gás hélio, com fluxo de 1,69 mL/min (100 kPa) e utilizado o modo splitless. Para a injeção, foi preparada uma solução de 1mg/L do extrato no seu respectivo solvente de extração, ou seja, em Etanol. Posteriormente, 1 μL dessa solução foi injetada no cromatógrafo. O espectrômetro de massas operou a 70 eV no modo SCAN (Full Scan) com relação m/z iniciando em 35 e finalizando em 650. Os compostos foram identificados por comparação com espectros de massas disponibilizados nas bibliotecas NIST14, NIST14s e Wiley9, sendo considerados os compostos com mais de 70% de similaridade. A quantificação relativa de cada composto foi realizada por normalização de área com os seguintes parâmetros de integração: Slop: 100/min, width: 2 s, drift: 0/min, T.DBL 1000 min, mínima relação área/altura: 10 e sem nenhum smoothing usado no método.

3.6 Análise por CLAE do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

As análises por CLAE foram realizadas no Laboratório de Análise Instrumental do Instituto Federal de Alagoas (IFAL) em cromatógrafo Shimadzu (LC-20A), com os seguintes componentes: forno (CTO-20A), amostrador automático (SIL-20A), detector UV/VIS (SPD-20A), degaseificador (DGU-205R), controladora (CBM-20A) e coluna C18 Shim-pack (tamanho das partículas 5 µm, 250 mm de comprimento e 4,6 mm de diâmetro). Foi utilizado o software LC-Solution 1.0 para processamento dos dados. O extrato e os padrões foram filtrados em filtros Allcrom, tipo PVDF (Fluoreto de polivinilideno), porosidade de 0,45 µm, e diâmetro de 13 mm. As condições experimentais foram configuradas da seguinte forma: fluxo de 0,6 mL/min, tempo de análise de 80 min, volume de injeção de 20 µL, temperatura do forno de 33 °C e comprimento de onda de 290 nm, sendo a fase móvel constituída dos solventes A (solução de ácido fórmico 0,1%) e B (metanol). As amostras e padrões analíticos foram eluídos de acordo com o gradiente de variação: de 0 a 15 minutos (7-25% B); 15 a 38 minutos (25-50% B); 38 a 58 minutos (50-85% B); 58 a 62 minutos (85-25% B); 62 a 80 minutos (25-7% B).

A identificação de compostos no extrato foi realizada por comparação do tempo de retenção (tR) com aqueles obtidos injetando padrões obtidos sob as mesmas condições. Para quantificação, foi construída uma curva analítica (10 pontos) a partir de uma solução contendo uma mistura de todos os padrões obtidos da Merck com alta pureza (ácido gálico (≥97,5%), catequina (≥95%), ácido clorogênico (≥95%), epicatequina (≥95%), seringaldeído (≥99%), ácido cumárico (≥98%) e ácido salicílico (≥98%). Para isso, foram preparadas soluções com concentrações que variaram de 1 a 10 ppm em solução metanol:água (70:30 v/v). A concentração injetada do extrato foi de 200 ppm. Após determinação da concentração expressa em ppm de cada analito obtida a partir da curva analítica, foi realizada a conversão da concentração para mg do composto por g de extrato [38].

3.7 Protocolo experimental

3.7.1 Indução da resposta inflamatória pulmonar – isquemia e reperfusão

Após os animais serem anestesiados com cloridratos de cetamina e xilazina 10%, ambos nas doses de 0,1 mL/100g, realizou-se a indução do processo inflamatório segundo o método descrito e adaptado por [39], após a laparotomia e

oclusão da artéria mesentérica superior durante 60 minutos, com o auxílio de um *cluster* (Figura 1). Durante o período isquêmico, a cavidade abdominal foi mantida com o auxílio de uma película plástica evitando a perda excessiva de calor. A reperfusão intestinal restabeleceu após a liberação do *cluster*. Decorrido o tempo de isquemia, retirou-se o *cluster* e foi feita uma incisão mediana fechada com sutura contínua com o fio de nylon.



Figura 3.1: Laparotomia e oclusão da artéria mesentérica superior com o auxílio de um *cluster*.

3.7.2 Tratamento

O tratamento foi realizado usando um Inalador Nebulizador NS Inalar Compact[®] (método de nebulização - compressão de ar e diâmetro da partícula de 0,5 mm a 10 mm) em que os animais ficaram sujeitos à inalação durante 180 segundos, sobre um ponto único na pele em direção a traqueia, após o tempo desejado de isquemia descrito na Figura 2.

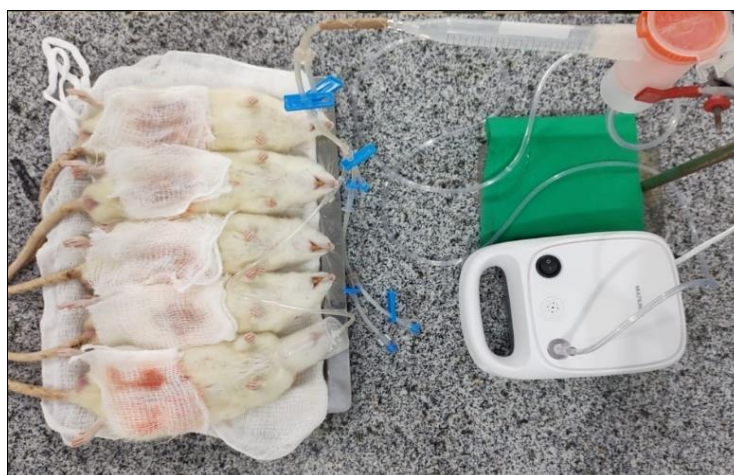


Figura 3.2: Terapêutica realizada com nebulização - associação de extrato liofilizado de *P. insignis* e bromidrato de fenoterol.

3.7.3 Lavado broncoalveolar

O lavado broncoalveolar – LBA foi obtido de acordo com a técnica desenvolvida e adaptada por [40]. Inicialmente, foi realizada uma incisão longitudinal, utilizando pinça e tesoura cirúrgica, na região cérvico-ventral com a finalidade de expor a traqueia do animal. Foi inserida na traqueia uma cânula diagonal conectada com uma seringa de 20 mL, como demonstrado na Figura 3, contendo solução fisiológica 0,9 %. Depois de injetada, logo em seguida foi aspirada uma suspensão celular. O LBA coletado foi armazenado em um tubo eppendorf, mantido em gelo para manter a viabilidade celular para ser utilizada na contagem de células totais.



Figura 3.3: Exposição da traqueia através da incisão longitudinal na região cérvico-ventral.

3.7.4 Contagem de células totais

O material recolhido foi centrifugado em 1500 RPM durante 10 minutos. Em seguida foi adicionada uma pequena quantidade do corante de azul de metileno. A suspensão celular corada foi colocada em uma câmara de Neubauer com o auxílio de uma lamínula para contagem de células totais. A leitura das lâminas foi realizada em um microscópio óptico com um aumento de 100 x.

3.7.5 Eutanásia

Após a indução do processo inflamatório, tratamento e coleta de sangue, do pulmão e coração, os animais de todos os grupos foram eutanasiados com aplicação intravenosa de 100 mg/kg de tiopental. Após o êxito deste procedimento as carcaças dos animais foram acondicionadas em ambiente refrigerado.

3.7.6 Análise histológica do pulmão

Duas horas após a reperfusão intestinal, os pulmões foram removidos e fixados em formaldeído a 10%, tamponado, por pelo menos 24 horas. Em seguida, um fragmento do lobo esquerdo do pulmão foi submetido a processamento histológico, obtendo-se preparações que foram coradas pela hematoxilina - eosina (HE). As amostras foram examinadas em um microscópio óptico trinocular (Olympus® CX31, Japão), equipado com uma câmera digital (Bell & Howell, EU 16.0 Plus, U.S.A.) acoplada a um microcomputador.

3.7.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 5.0 para análises de ANOVA seguido de teste de Tukey. Uma diferença em $P < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa. Os resultados foram expressos como média e desvio padrão.

Capítulo 4

RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Triagem fitoquímica por prospecção preliminar do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*

Na bioprospecção preliminar fitoquímica realizada no extrato etanólico das folhas de *P. insignis*, pode-se constatar, os seguintes grupos de metabólitos: alcaloides, saponinas e triterpenos.

A presença de alcaloides e saponinas no extrato etanólico de *P. insignis* corroboram com os resultados encontrados nos estudos de [41]. Os alcaloides são apontados como um dos compostos majoritários nos extratos das folhas do bacuri. Estes são conhecidos por apresentarem diversas propriedades farmacológicas, como antimalárica, antimicrobiana e citotóxica [42].

A triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* realizado por [43], apresentou os flavonoides, na qual exibem inúmeras atividades biológicas, tais como anti-inflamatória e antioxidante. Em comparação, a triagem fitoquímica do extrato etanólico das folhas do bacuri realizada mostrou possível ausência desse grupo de metabólitos. Isto pode ser explicado, pelas variações ambientais, pois influenciam na produção de metabólitos secundários, bem como as suas quantidades, associado à incapacidade do método de gerar resultado mensurável [44,45].

4.2 Análise por CG-EM do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*.

Análise por CG-EM realizada no extrato etanólico das folhas de *P. insignis*, revelou a presença de sessenta compostos fitoquímicos. Alguns compostos apresentaram percentuais de áreas mais significativas e outros menos. No caso do extrato etanólico, os compostos fitol (31), gama – sitosterol (43) e ácido hexadecanóico (27) mostraram um maior percentual relativo de área, sendo de 10,54%, 9,88% e 9,84%, respectivamente. Em menor quantidade estão os compostos ethanona, 1 - (2-hidroxi-5-metoxifenil) (2) com 0,14%, decahidro - 1, 5, 5,

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

8a - tetrametil - 1, 4 - metanoazuleno - 9 - ol (10) com 0,14% e DL - arabinitol (5) com 0,15 % como apresentado na Tabela 2.

Tabela 4.1: Composição fitoquímica do extrato etanólico das folhas da *P. insignis* por análise em CG-EM com seus respectivos: tempos de retenção (T_R min), compostos, fórmulas e massas moleculares e percentuais relativos de área (%).

Nº	T_R (min)	Compostos	Fórmula molecular	Área Absoluta	P. relativo de área (%)
01	17.376	Catecol	$C_6H_4(OH)_2$	15221496	3,34
02	19.708	Etanona, 1- (2-hidroxi-5-metoxifenil)	$C_9H_{10}O_3$	643172	0,14
03	22.466	1,2,3-Benzenotriol	$C_6H_6O_3$	1808962	0,40
04	24.827	α -D-Xilofuranose, 1,2-O-isopropilideno-5- (T-Butildimetilsilil)	$C_8H_{14}O_5$	751129	0,16
05	26.985	DL-Arabinitol	$C_5H_{12}O_5$	665153	0,15
06	28.025	1,3,5-Benzenotriol	$C_6H_6O_3$	26859048	5,89
07	28.120	Não identificado	$C_6H_6O_3$	13251512	2,91
08	28.360	1-Oxaspiro [2,5] octano, 2,4,4-trimetil-8-metileno	$C_{11}H_{18}O$	1515276	0,33
09	28.987	Etil α -d-glucopiranosídeo	$C_8H_{16}O_6$	2656998	0,58
10	30.653	Decahidro-1,5,5,8a-tetrametil-1,4-metanoazuleno-9-ol	$C_{15}H_{26}O$	644111	0,14
11	30.807	2-Ciclohexen-1-ona, 4-	$C_{13}H_{22}O_2$	886575	0,19

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

(3-hidroxibutil) -3,5,5-					
trimetil					
2,4,6-					
12	31.302	Trihidroxibenzoato de metila	$C_8H_8O_5$	857283	0,19
13	31.999	Não identificado	$C_{14}H_{28}O_2$	1190726	0,26
14	32.264	Ácetil éster 2- (2,2,6-trimetil-7-oxa-biciclo [4.1.0] hept-1- il) - propenil	$C_{17}H_{24}O_3$	866694	0,19
15	32.769	Ácido tetradecanóico	$C_{14}H_{28}O_2$	1448774	0,32
16	33.103	Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	7138473	1,57
17	33.706	Acetato de fitila	$C_{22}H_{42}O_2$	30063719	6,59
18	33.884	2-Pentadecanona, 6,10,14 trimetil	$C_{18}H_{36}O$	822376	0,18
19	34.282	Não identificado	$C_{20}H_{40}O$	7628271	1,67
20	34.282	3,7,11,15-Tetrametil-2 hexadecen-1-ol	$C_{20}H_{40}O$	12189761	2,67
21	34.904	Ácido pentadecanoico	$C_{15}H_{30}O_2$	845750	0,19
22	35.560	Não identificado	$C_{16}H_{32}O_2$	1022830	0,22
23	36.017	Isofitol	$C_{20}H_{40}O$	1034471	0,23
24	36.307	1 - (+) -Ácido ascórbico 2,6-dihexadecanoato	$C_{38}H_{68}O_8$	26460058	5,80
25	36.445	10- (Tetrahydro-piran-	$C_{15}H_{20}O_3$	1031173	0,23

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

2-iloxi) tríciclo

[4.2.1.1(2,5)] decan-9-

ol

26	36.814	9-Hexadecenoato de etila	$C_{18}H_{34}O_2$	1015310	0,22
27	36.949	Ácido hexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_2$	44888316	9,84
28	38.882	Ácido heptadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2$	4421162	0,97
29	39.025	Ácido 10,13-eicosadienoico	$C_{20}H_{32}O_2$	1268164	0,28
30	39.180	2-Ciclohexen-1-ol, 3-metil-6-(1-metil etil)	$C_{10}H_{18}O$	1011550	0,22
31	39.271	Fitol	$C_{20}H_{40}O$	48074827	10,54
32	39.600	Ácido 9,12-octadecadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$	2013470	0,44
33	39.723	Cis-9-hexadecenal	$C_{16}H_{30}O$	10928511	2,40
34	39.821	1-Hexadecin-3-ol, 3,7,11,15-tetrametil	$C_{20}H_{40}O$	3840635	0,84
35	40.167	Ácido 9,12-octadienóico	$C_{18}H_{32}O_2$	10987020	2,41
36	40.290	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico	$C_{18}H_{30}O_2$	29269649	6,42
37	40.379	Oleato de etila	$C_{20}H_{38}O_2$	1363973	0,30
38	40.741	Ácido octadecanoico	$C_{18}H_{36}O_2$	10488450	2,30
39	41.022	Danthron	$C_{14}H_8O_4$	1664012	0,36
40	43.727	5,5-Dimetil-3-	$C_8H_{14}O$	1825669	0,40

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

ciclohexen-1-ol					
41	44.236	Ácido heptadecanoico	$C_{17}H_{34}O_2$	706120	0,15
2,6,10,14-					
42	45.190	Hexadecatetraen-1-ol, 3,7,11,15-tetrametil	$C_{20}H_{34}O$	1554793	0,34
43	45.570	Gama-Sitosterol	$C_{29}H_{50}O$	45042060	9,88
Ácido 2-					
44	46.196	hidroxihexadecanoico	$C_{16}H_{32}O_3$	2487445	0,55
45	47.929	Não identificado	$C_{18}H_{36}O_2$	731474	0,16
Ácido					
46	50.170	octadecadienóico,2,3- dihidroxi propil ester	$C_{21}H_{42}O_4$	816238	0,18
Elaidato de 2,3-					
47	50.268	dihidroxi propil	$C_{21}H_{40}O_4$	1656225	0,36
Ácido 9,12,15-					
48	50.403	octadecatrienoico	$C_{18}H_{30}O_2$	2600239	0,57
Tetracosanoato de					
49	53.446	etila	$C_{26}H_{52}O_2$	1825885	0,40
50	54.657	Esqualeno	$C_{30}H_{50}$	4397081	0,96
51	57.433	Não identificado	$C_{54}H_{110}$	1799055	0,39
52	58.854	Supraene	$C_{30}H_{50}$	10068101	2,21
53	59.324	Lup-20 (29) -en-3-ona	$C_{30}H_{48}O$	2636581	0,58
Fenol, 3-metoxi-5-					
54	60.274	metil-2- (3,7,11-trimetil- 2,6,10-dodecatrienil) -	$C_{25}H_{36}O_3$	12543398	2,75

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

,acetato, (E, E)					
55	61.215	Estigmast-4-en-3-ona	C ₂₉ H ₄₈ O	16273187	3,57
56	65.275	Gama-tocoferol	C ₂₈ H ₄₈ O ₂	1964618	0,43
2- (3,7-Dimetil-octa-					
57	65.930	2,6-dienil) -4-metoxi-	C ₁₇ H ₂₄ O ₂	4831378	1,06
fenol					
58	66.809	Colestan-3-1, (5.alpha)	C ₂₇ H ₄₆ O	1828248	0,40
59	68.869	Tetrapentacontano	C ₅₄ H ₁₁₀	3812580	0,84
60	70.800	Vitamina E	C ₂₉ H ₅₀ O ₂	7948380	1,74

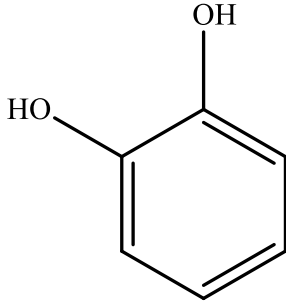
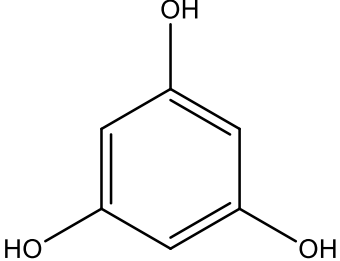
O fitol é o principal composto majoritário presente no extrato desta planta. Na literatura, do ponto de vista terapêutico o fitol e seus análogos demonstram atividade antimicrobiana [46] e antituberculose [47]. Em um estudo realizado por [48], demonstrou que o fitol atua como ativador de nicotinamina adenina denucleotídeo fosfato oxidase (NADPH oxidase), apresentando efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em modelos de artrite reumatóide.

Já os compostos, ácido hexadecanóico (22), ácido 9, 12, 15 - octadecatrienóico (36) e ácido octadecanóico (38) encontrados na fração oleosa das sementes de bacuri, mostrou-se presentes como compostos majoritários em um estudo realizado por [49]. Essa fração oleosa apresentou efeito cicatrizante, ao ser testada em ferida cutânea em ratos [50].

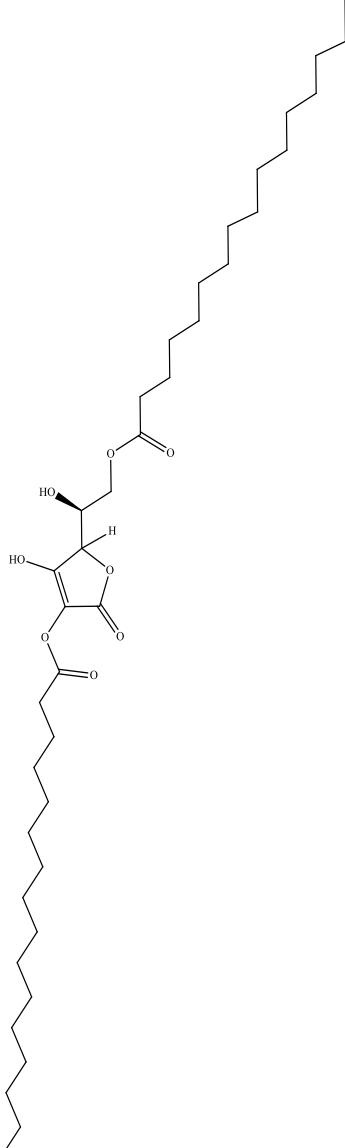
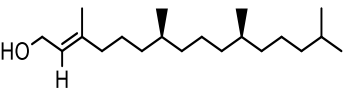
Os compostos fenólicos, são metabólitos secundários que se destacam por apresentar propriedades antirradicais, ou seja, as plantas são como fontes naturais de substâncias antioxidantes, como o ácido ascórbico, catecol e 1,3,5-Benzenotriol encontrados neste estudo [51,52].

Em um estudo com o extrato metanólico do fruto de *P. insignis* realizado por [53] foi encontrado Vitamina E como um dos principais compostos majoritários presentes no extrato. Já no extrato etanólico das folhas este composto foi encontrado em uma menor quantidade (1,74%). Percebe-se com isso, que a espécie estudada apresenta uma variedade de compostos fitoquímicos, apresentados no Quadro 1, contendo a sua fórmula estrutural e atividade biológica já descrita na literatura.

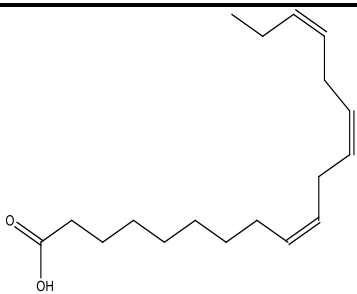
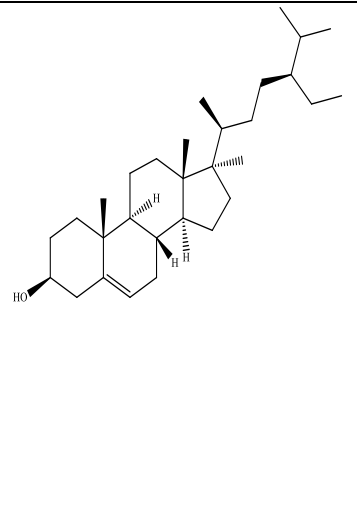
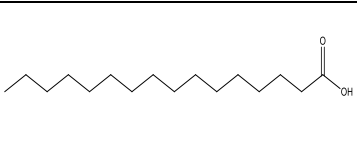
Quadro 1: Compostos identificados por CG-EM no extrato etanólico das folhas de *P. insignis* com suas respectivas atividades biológicas.

Nº	Compostos	Estrutura molecular	Grupo fitoquímico	Atividade Biológica
1	Catecol		Composto fenólico	Antioxidante, anti-inflamatório e neuroprotetor (ZHENG et al, 2008).
2	1,3,5-Benzenotriol		Composto fenólico	Antidepressivo, anticonvulsivo (SPECCHIO et al, 2004; EPPS et al, 2013).

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

3	<p>I-(+)-Ácido ascórbico 2,6- dihexadecanoat o</p>		<p>Composto fenólico</p>	<p>Antioxidante (CATANIA et al, 2009).</p>
4	<p>Fitol</p>		<p>Álcool Diterpenoide</p>	<p>Anti-inflamatória, antioxidante, antimicrobiana, anticâncer e diurética (VATS, 2017).</p>

Capítulo 4 - Resultados e Discussão

5	Ácido 9,12,15 octadecatricoico		Ácido graxo	Anti-inflamatória (SALAS, 2008).
6	Gama-Sitosterol		Esteróide	Antidiabético, anti-hiperglicêmica e anti-hiperlipidêmica (BALAMURUGAN et al, 2012).
7	Ácido hexadecanóico		Ácido graxo	Antioxidante (VATS, 2017).

Na análise por CG-EM foi observado o aparecimento de compostos ainda não citados em outros trabalhos, como o gama-sitosterol, o que provavelmente, significa que o EEF de *P. insignis* pode apresentar composição química diferente da mesma espécie em outras regiões. A quantidade de compostos também varia de uma pesquisa para outra. Apenas os ácidos graxos e vitamina E presentes nas folhas de *P. insignis* estudadas, aparecem citadas em outras referências. Todos os demais compostos ainda não foram relatados nas folhas dessa espécie.

4.3 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência - CLAE do extrato etanólico das folhas de *P. insignis*.

Pela análise por CLAE foi possível identificar a presença de catequina, no EEF de *P. insignis*, através da comparação com o cromatograma dos padrões

analíticos por Mix do extrato etanólico com os padrões cromatográficos. Essa técnica também permitiu a quantificação desse composto através da construção de uma curva analítica usando os dados da amostra padrão. Para o composto mencionado, a concentração encontrada foi de 6,635 mg/g com um tempo de retenção (t_R) em 25.796, na faixa de comprimento de 290 nm, no espectro na região do UV-V.

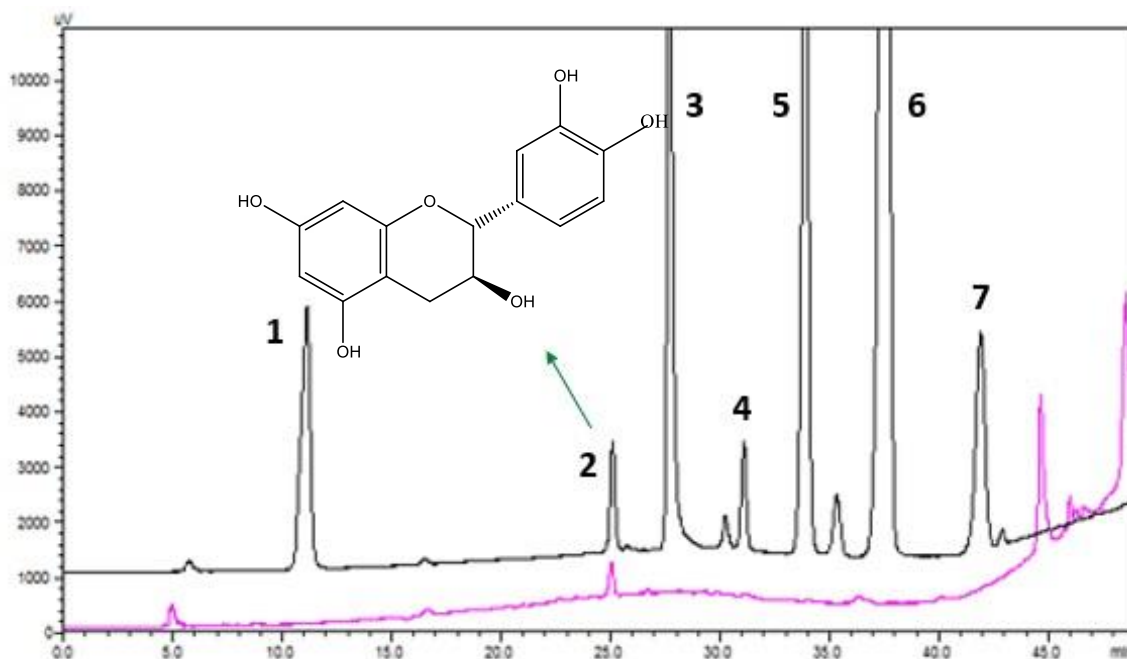


Figura 4.1: Cromatogramas do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* (curva rosa) e dos padrões cromatográficos (curva em preto) de ácido gálico (1), catequina (2), ácido clorogênico (3), epicatequina (4), seringaldeído (5), ácido cumárico (6) e ácido salicílico (7) em 290 nm.

Na busca de novas alternativas para o tratamento do processo inflamatório, os produtos naturais como os compostos fenólicos têm se destacado, por inibir a síntese de mediadores químicos da inflamação. Os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem um anel aromático e como substituinte uma hidroxila, podendo possuir outros grupos funcionais [54]. Uma variedade de compostos fenólicos que se destacam são os flavonoides como a catequina, presentes em abundância no extrato de *P. insignis*. Estes estão presentes na dieta

dos seres humanos, e existem inúmeras propriedades biológicas, como por exemplo, ação anti-inflamatória, promoção da vasodilatação, ação hormonal e atividade antioxidante [43].

A catequina pode regular a infiltração e proliferação de células relacionadas ao sistema imunológico, como neutrófilos, células epiteliais do cólon, macrófagos e linfócitos T, contribuindo a reduzir as relações inflamatórias [55].

4.4 Análise histológica do pulmão

A indução da síndrome respiratória aguda grave por isquemia e reperfusão intestinal em ratos, resultou na dilatação acentuada dos bronquíolos terminais e respiratórios e dos alvéolos circunjacentes. Foi observado também a presença de células inflamatórias, sobretudo macrófagos.

Os macrófagos também participam dos mecanismos indutores da lesão pulmonar causada pela I/R intestinal, uma vez que estas células produzem e secretam uma gama de mediadores e indutores da resposta imune e inflamatória, como citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, que promovem o recrutamento de neutrófilos para o sítio da inflamação [56,57].

Pode se observar que em relação ao número de células inflamatórias os grupos IR/E, IR/B e IR/BE apresentaram uma redução quanto ao número de presença de macrófagos. No entanto, não houve diferença significativa entre os mesmos, conforme mostra na figura 4.2.

O grupo dos broncodilatadores de ação curta, inclui o bromidrato de fenoterol. Seu efeito quando administrado por via inalatória, tem início em poucos minutos e dura de 4 a 6 horas e constituem a primeira opção broncodilatadora nas exacerbações [58].

A ação broncodilatadora se dá através da ativação do receptor β_2 – adrenérgico acoplado à proteína G na superfície celular, levando ao aumento da atividade da adenilciclase, enzima que catalisa a conversão do ATP em AMPc, promovendo a liberação de sua unidade catalítica que causa fosforilação de um grande número de proteínas alvo, relaxando o músculo liso peribrônquico. O AMPc inibe a liberação de cálcio dos depósitos intracelulares e reduz o influxo de cálcio através da membrana, auxiliando o relaxamento da musculatura lisa e a broncodilatação [59].

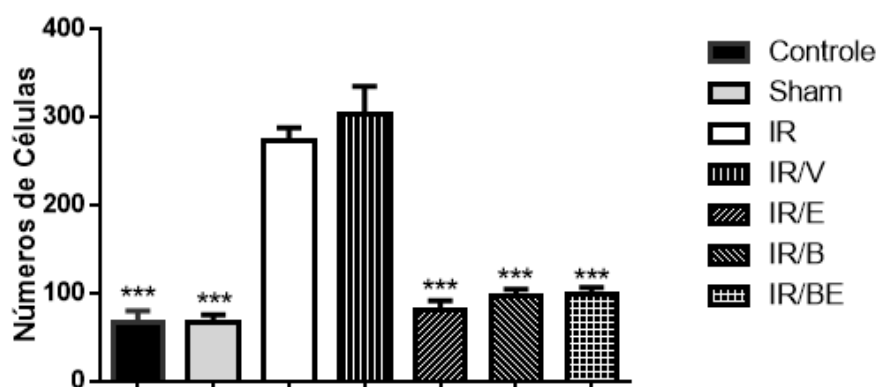


Figura 4.2: Análise estatística do número de células inflamatórias do LBA dos pulmões dos animais tratados com extrato etanólico das folhas de *P. insignis* e bromidrato de fenoterol ***= $p < 0,001$ comparado ao grupo IR e IR/V. ANOVA seguida de Tukey.

Na avaliação histológica em um estudo realizado por [59] foi confirmada a existência da resposta inflamatória após o processo de I-R, corroborando o resultado do nosso estudo onde houve o aumento de células inflamatórias em tecido pulmonar de ratos do grupo controle IR e IR/V em comparação com os grupos tratados mediante terapêutica aplicada, apresentando uma menor quantidade de infiltrado inflamatório, sugerindo a ação anti-inflamatória do Bacuri.

A análise histológica qualitativa dos pulmões corados com H.E revelou diferença significativa entre os grupos (Figura 4.3). No grupo A, a estrutura pulmonar dos animais mostrou aspecto normal, sem dilatação. O compartimento incluía bronquíolos terminais, e sacos alveolares dentro dos padrões considerados normais, com ausência de atividade inflamatória nos brônquios, bronquíolos e alvéolos. No grupo B os bronquíolos terminais apresentaram dilatação leve, além de congestão vascular moderada. No grupo C e grupo D há a presença de numerosos macrófagos livres nos espaços alveolares, e dilatação acentuada dos bronquíolos terminais e respiratórios.

Os grupos E, F e G que receberam tratamento tinham características semelhantes como: os bronquíolos terminais, respiratórios e alvéolos com dilatação menos acentuada, ou seja, um menor número de macrófagos livres nos espaços alveolares.

A respeito do mecanismo de ação do extrato etanólico de *P. insignis* sobre a redução do número de células inflamatórias podemos sugerir que houve proteção celular contra danos oxidativos induzidos por I/R-i, sendo mediada por componentes antioxidantes presentes no Bacuri. Fato este que se justifica, com a intensidade da inflamação presente no exame histológico do pulmão dos animais do grupo tratado, apresentem significativa redução do número de células inflamatórias, ao comparar-se com o número de células inflamatórias presentes no grupo controle, significativamente maiores e isento de tratamento.

A *P. insignis* é popularmente conhecida como Bacuri e sua utilização etnofarmacológica está associada com os efeitos cicatrizante e anti-inflamatória e diversas atividades vem sendo relatadas para todas as partes deste fruto (semente, casca e polpa). O óleo das sementes de *P. insignis* é rico em ácido graxo,

favorecendo o processo de cicatrização de feridas cutâneas em ratos [49]. Tais estudos reforçam a ação anti-inflamatória do Bacuri, minimizando os danos celulares no pulmão de ratos.

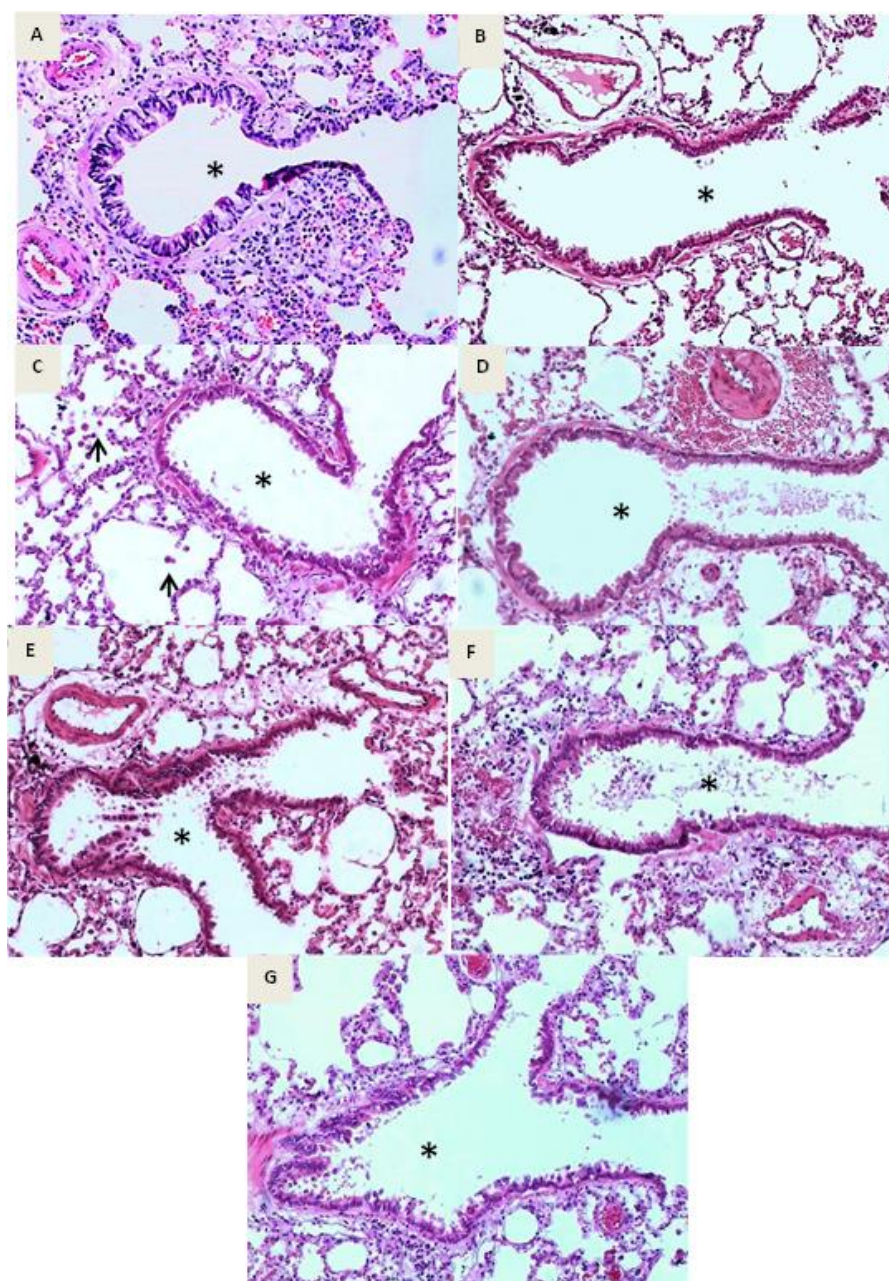


Figura 4.3: Fotomicrografias de histologia do pulmão. A) Não manipulado. B) Aberto, não manipulado. C) Isquemia, não tratado. D) Isquemia, tratado com veículo. E) Isquemia, tratado com extrato. F) Isquemia, tratado com bromidrato de fenoterol. G) Isquemia, tratado com bromidrato de fenoterol + extrato; * árvore brônquica – bronquíolos terminais. Coloração H&E foi realizada na objetiva 100x.

No entanto, os achados histológicos indicam que a lesão por isquemia e reperfusão intestinal, induziu lesões pulmonares agudas e acentuadas, caracterizadas especialmente pela presença de abundantes macrófagos livres nos espaços alveolares, como se pode observar quando são comparados os grupos não manipulados A e B e o grupo C, que foi submetido a isquemia e reperfusão intestinal. Além disso, os grupos F (tratados com bromidrato de fenoterol) e G (bromidrato de fenoterol + extrato liofilizado de *P. insignis*) apresentaram os melhores resultados, quando comparado com o grupo D (tratado apenas com o veículo).

Neste trabalho, demonstramos que a associação do extrato etanólico das folhas de *P. insignis* + bromidrato de fenoterol (agiu como um broncodilatador facilitando a chegada do extrato nos alvéolos) foram capazes de estagnar a dilatação dos bronquíolos terminais e respiratórios e dos alvéolos, diminuindo o número de macrófagos livres nos espaços alveolares, sugerindo como justificativa, a presença da catequina, identificado por técnicas cromatográficas no extrato etanólico de *P. insignis*, evidenciando um potencial efeito benéfico no tratamento da síndrome respiratória aguda por isquemia e reperfusão intestinal induzida em ratos.

Capítulo 5

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A bioprospecção preliminar fitoquímica, mostrou a presença de metabólitos secundários alcaloides, saponinas e triterpenos no extrato etanólico das folhas de *P. insignis*. A análise por CG-EM revelou 60 compostos fitoquímico. Na análise por CLAE identificou e quantificou a catequina (6,635 mg/g), demonstrando o efeito anti-inflamatório da *P. insignis* no tratamento da síndrome do desconforto respiratório agudo.

Verifica-se, portanto, que o extrato de *P. insignis* exerce um certo efeito de diminuição da síndrome do desconforto respiratório agudo, porém necessita um estudo mais profundo que aborde a ação do extrato nas células.

REFERÊNCIAS

- [1] HUANG Y, et al. Structural and functional properties of the SARS-CoV-2 spike protein: potential antivirus drug development for COVID-19. **Acta Pharmacol Sin**, 2020; 41: 1141–1149. <https://doi.org/10.1038/s41401-020-0485-4>.
- [2] DE ALBUQUERQUE LP, et al. COVID-19: origin, pathogenesis, transmission, clinical aspects and current therapeutic strategies. [Internet]. 2020;6:10432. <https://doi.org/10.26694/repis.v6i0.10432>.
- [3] J. CUI, F. LI, Z.-L. SHI. Origin and evolution of pathogenic coronaviruses. **Nat Ver Microbiol**, 2019, pp.181 – 192. <http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0118-9>.
- [4] OLIVEIRA, ROSELAINE PINHEIRO DE; TEIXEIRA, CASSIANO; ROSA, RÉGIS GOULART. Acute respiratory distress syndrome: how are patients doing after intensive care unit? **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 31, n. 4, p. 555-560, 2019. <https://doi.org/10.5935/0103-507X.20190074>.
- [5] KALOGERIS, T., et al. Ischemia/Reperfusion. **Comprehensive Physiology**. v. 7, p. 113-70, 2016. <http://dx.doi.org/10.1002/cphy.c160006>.
- [6] VERCESI, A. E, et al. Mitochondrial calcium transport and the redox nature of the calcium-induced membrane permeability transition. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 129, p. 1-24, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.034>
- [7] ISER, BPM; et al., Covid-19 suspect case definition: a narrative review of the most frequent signs and symptoms among confirmed cases. **Epidemiol. Serv. Saúde**, 2020; 29(3): e2020233. <http://dx.doi.org/10.5123/s1679-49742020000300018>.
- [8] SANTANA, G.; SILVA, A.M. The use of medicinal plants in the treatment of anxiety. **III Simpósio de Assistência Farmacêutica**. São Paulo, 2015.
- [9] LUSTOSA, AKMF; et al. Immunomodulatory and toxicological evaluation of seeds from the fruits of *Platonia insignis*, a native species of the Brazilian Amazon rainforest. **Rev. Bras. Farmacog.** 2016, 26,77-82. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.05.014>.
- [10] TEIXEIRA, N.; et al. Edible fruits from the Brazilian biodiversity: a review on their sensory characteristics versus bioactivity as a tool to select research. **Food Res. Int.** 2019, 119, 325-348. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.01.058>.

- [11] DO NASCIMENTO, CA.; et al. Toxicidade, citotoxicidade, mutagenicidade e modelos antioxidantes in vitro de 2-oleil-1,3-dipalmitoil-glicerol isolado do extrato hexânico de sementes de *Platonia insignis* Mart. **Tóxico**. Rep. 2020; 7 :209-216.
- [12] UZUNIAM A. Coronavírus SARS-CoV-2 and Covid-19. **J Bras Patol Med Lab**. 2020; 56: 1-4. <https://doi.org/10.5935/1676-2444.20200053>.
- [13] ZHONG, N. S. et al. Epidemiology and cause of severe acute respiratory syndrome (SARS) in Guangdong. Republica Popular da China, em Fevereiro de 2003. *Lancet*, v.362, n.9393, p.1353-1358, 2003.
- [14] LI Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Tong Y. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus–Infected Pneumonia. **N Engl J Med**. 2020; 382 (13):1199-207.
- [15] JIANG, S., DU, L., and SHI, Z. An emerging coronavirus causing pneumonia outbreak in Wuhan, China: calling for developing therapeutic and prophylactic strategies. **Emerg Microbes Infect**. 9, 275–277, 2020.
- [16] GUAN WJ, Ni ZY, Hu Y, Liang WH, Ou CQ, He JX, et al. Clinical characteristics of coronavirus disease 2019 in China. **N Engl J Med**. 2020 Feb 28.
- [17] RIOS, F.; ISCAR, T.; PABLO, C. F. What should every intensivist know about acute respiratory distress syndrome and diffuse alveolar damage? **Rev Bras Ter Intensiva**. 2017.
- [18] DA COSTA, D. A. Síndrome de dificuldade respiratória aguda-SDRA. **Tese de Mestrado Integrado em Medicina**. 2020.
- [19] WILSON, J.G.; CALFEE, C.S. ARDS Subphenotypes: Understanding a Heterogeneous Syndrome. Annual Update in Intensive Care and Emergency Medicine. **Springer, Cham**, 2020.
- [20] BARBAS, C.S.V., MATOS, G.F.J. Acute Respiratory Distress Syndrome: Definition. **Sumário Content**, 2011.
- [21] PINHEIRO, Bruno V.; LISBOA, Laura FM; HOLANDA, Marcelo A. Risk factors in acute respiratory distress syndrome. **Pulmão RJ**, v. 20, n. 1, p. 13-18, 2011.
- [22] GARCIA, Cristiane SNB; PELOSI, Paolo. Differences between Pulmonary and Extrapulmonary Forms of Acute Respiratory Distress Syndrome. **Pulmão RJ**, v. 20, n. 1, p. 19-23, 2011.
- [23] PIANTADOSI, C. A., SCHWARTZ, D. A. Acute respiratory distress syndrome. **Ann Intern Med.**, v.141, n. 6, p. 460-470, 2004.

- [24] RIBEIRO, M.A.; YOSHIDA, W.B. Reperfusion injury after intestinal ischemia: pathophysiology and experimental models. **J. Vasc. Br.**, v. 4, n. 2, p. 183-194, 2005.
- [25] CERQUEIRA, N.F.; HUSSNI, C.A.; YOSHIDA, W.B. Pathophysiology of mesenteric ischemia/reperfusion: a review. **Acta Cir. Bras** v.20, n.4, p. 336-343, 2005.
- [26] DEBUS, E. S.; DIENER, H.; LARENA-AVELLANEDA, A. Acute intestinal ischemia. **Chirurg.**, v. 80, n. 4, p. 375–385, 2010.
- [27] SIROTKOVIĆ-SKERLEV, M.; PLESTINA, S.; BILIĆ, I.; KOVAC, Z. Pathophysiology of ischaemia –reperfusion injury. **Lijec Vjesn.** v.128, n.3-4, p.87-95, 2006.
- [28] VICTONI, T.; et al. Local and remote tissue injury upon intestinal ischemia and reperfusion depends on the TLR/MyD88 signaling pathway. **Med. Microbiol. Immunol.**, v. 199, n. 1, p. 35-42, 2010.
- [29] QURESH, R. GHAZANFAR, S. A.; OBIED, H.; VASILEVA, V.; TARIQ, M. A. Ethnobotany: a living science for alleviating human suffering. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v. 2016, p. 1-3, 2016.
- [30] Portella, C. F. S. Naturologia, transdisciplinaridade e transracionalidade. *Cadernos de Naturologia e Terapias Complementares*, 2013 2(3), 57-65.
- [31] ZENI, Ana Lúcia Bertarello et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.
- [32] ANDRADE, M. A. et al. Uso de plantas medicinais para o tratamento de feridas. **Revista Interdisciplinar**, v. 8, n. 2, p. 60-67, 2015.
- [33] BRUNING, M. C. R; et al. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu-Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & saúde coletiva**, v. 17, p. 2675-2685, 2012.
- [34] ALMEIDA, A. S; SANTOS, A. F. Prospecção fitoquímica do extrato metanólico das folhas da Espécie *Cymbopogon Citratus*. **Diversitas Journal**, v. 3, n. 2, p. 519-525, 2018.
- [35] FARIA, JV; et al. Avaliação comparativa da composição química e atividades biológicas de frutas tropicais consumidas em Manaus, Amazônia central, Brasil. **Alimentos Res. Int.** 139, 109836, 2021.

- [36] YAMAGUCHI, K.K.L.; et al. Amazonian Bacuri (*Platonia insignis* Mart.) Fruit Waste Valorisation Using Response Surface Methodology. **Biomolecules**, 11, 1767, 2021.
- [37] MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: Edit. UFC, 2009.
- [38] BEZERRA, M. S. S. Identification of bioactive compounds present in the ethanolic and hexane extracts of the leaves of *Moringa oleifera* Lam. 2021. **Rev. Virtual de Química**. 13:1303-1318. <https://doi.org/10.21577/1984-6835.20210078>.
- [39] LIMA et al. Low-level laser therapy restores oxidative stress balance in acute lung injury induced by intestinal ischemia and reperfusion. **Photochemistry and Photobiology**. p, 179–188, 2013. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1751-1097.2012.01214.x>.
- [40] DE CASTRO C.M.M.B; et al. 1995. Modulation by dexamethasone of phospholipase A2 activities in endotoxemic guinea pigs. **J. Appl. Physiol**. 79:1271-1277.
- [41] ROCHA, Emmeline de Sá. Produção de Bioprodutos com Atividade Antimicrobiana a partir do Extrato das Folhas de *P. insignis* Mart. Gurupi – TO, 2017.
- [42] OLOYEDE, K. G.; OKE, M. J.; RAJI, Y.; OLUGBADE, T. Alcalóides antioxidantes e anticonvulsivantes em extrato de bulbo de *Crinum ornatum*. **World J Chem**. 2010; 5: 26–31.
- [43] DOVICH, S. S.; LAJOLO, F. M. Flavonoids and their relation to Central Nervous System diseases. Nutrire: **rev. Soc. Bras. Alim. Nutr. = J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 36, n. 2, p. 123-135, ago. 2011.
- [44] ZIANE, B. E. C. et al. Detailed chemical composition and functional properties of *Ammodaucus leucotrichus* Cross. & Dur. And *Moringa oleifera* Lamark. **Journal of Functional Foods**, vol. 53, p. 237, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2018.12.023>.
- [45] MOHAMMED, S. Y. et al. Composition of *Moringa oleifera* Lam. From different regions of Sudan. **International Invention of Scientific Journal**, vol. 02, n. 07, p. 268, 2018. <http://iisj.in/index.php/iisj>;
- [46] RAJAB, M. S.; CANTRELL, C. L.; FRANZBLAU, S. C.; FISCHER, N. H. Atividade Antimicobacteriana de (E)-Fitol e Derivados: Um Estudo Preliminar de Estrutura e atividade. **Planta Médica**, v. 64, p. 2-4, 1998. <https://doi.org/10.1055/s-2006-957354>.

- [47] SAIKIA, D.; et al. Antitubercular potential of some semisynthetic phytol analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 20, p. 508-512, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2009.11.107>.
- [48] LEITE, A. C. R. M. Efeitos antiinflamatórios e antinoceptivos do fitol, um ativador de NADPH oxidase, e tadalafila, um inibidor de 5-fosfodiesterase, em modelos experimentais. 2010. 120f. **Tese de Doutorado** – Universidade Federal do Ceará, 2010.
- [49] SOARES, A.G. Caracterização físico-química do resíduo agroindustrial dos frutos do bacurizeiro (*Platonia insignis* Mart.) com objetivo de produção de insumos para indústria de alimentos e química. 2010. 104f. - **Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos)**, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.
- [50] SANTOS JÚNIOR RQ, SOARES LC, MAIA FILHO ALM, ARAUJO KS, SANTOS IMSP, COSTA JÚNIOR JS, SAFFI J. Estudo histológico da cicatrização de feridas cutâneas utilizando a banha de bacuri (*Platonia insignis* Mart.). **ConScientiae Saúde**. 9(4): 575-581, 2010.
- [51] ALENCAR, D. B.; et al. Potencial antioxidante e atividade citotóxica de espécies de algas vermelhas, *Amansia multiflora* e *Meristiella echinocarpa*, do litoral do Nordeste do Brasil. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, n.1, p. 251-263, 2014. <https://doi.org/10.1590/0001-37652014116312>.
- [52] OLIVEIRA, A. C.; et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- [53] RUFINO MSM, ALVES RE, BRITO ES, PÉRES-JIMÉZEZ J, SAURACALIXTO F, MANCINI-FILHO J. Bioactive compounds and antioxidant capacity of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **FoodChem**. 121(4): 996-1002, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.01.037>.
- [54] SIMÕES, C. M. O.; et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, p.1104, 2007.
- [55] FAN, F. Y. et al. Cathechins and their therapeutic benefits for inflammatory bowel disease. **Molecules**, vol. 22, n. 3, p. E484, 2017. <https://doi.org/10.3390/molecules22030484>.
- [56] BORJESSON, A.; et al. TNF-alpha stimulates alveolar fluid clearance during intestinal ischemia-reperfusion in rats. **Am. J. Pshysiol. Lung Cell. Mol. Physiol.**, v. 278, p. I3-I12, 2000. <https://doi.org/10.1152/ajplung.2000.278.1.L3>.

- [57] MORAES, L. B.; et al. Acute lung injury induced by intestinal ischemia/reperfusion - an alveolar macrophage-dependent event. **J. Trauma.**, v. 64, p. 1196-2000, 2008. <https://doi.org/10.1097/TA.0b013e31816c5ca6>.
- [58] CAMPOS, H. S; CAMARGOS P. A. M. Broncodilatadores. **Pulmão.** Rio de Janeiro; 21 (2): 60-64, 2012.
- [59] ROCHA, S. L., et al. Arterial blood gas and lung inflammation at different times of abdominal sepsis. **Arq. Bras. Cir. Dig.** São Paulo, v. 20. n. 1, p – 28 – 33, 2007.