

BRENO CÉSAR VIEIRA

**ANÁLISES FITOQUÍMICA, BROMATOLÓGICA, TOXICOLÓGICA E DOS
EFEITOS ESTIMULANTE FÍSICO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *Psychotria vellosiana* BENTH**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS - BRASIL
2010

BRENO CÉSAR VIEIRA

**ANÁLISES FITOQUÍMICA, BROMATOLÓGICA, TOXICOLÓGICA E DOS
EFEITOS ESTIMULANTE FÍSICO E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE
FOLHAS DE *Psychotria vellosiana* BENTH**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Viçosa,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Bioquímica Agrícola, para obtenção
do título de *Magister Scientiae*.

APROVADA: 24 de setembro de 2010.

Prof. Antônio José Natali
(Co-orientador)

Prof^a. Sônia Machado Rocha Ribeiro
(Co-orientador)

Prof. Clovis Andrade Neves

Prof^a. Luciana Moreira Lima

Prof. João Paulo Viana Leite
(Orientador)

A Deus, por me conceder o dom da vida.

À minha mãe Mariana, pelo amor e apoio, mesmo à distância.

À minha esposa Patrícia e minha filha Sofia, por darem um novo significado a minha vida, por serem meu porto seguro, onde renovo minhas forças e abasteço-me para continuar a jornada. Obrigado pelo apoio incondicional e motivação constante.

“Deus não escolhe os capacitados, mas capacita os escolhidos”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa, à Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola, ao Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, pela oportunidade de realização deste curso.

Aos Departamentos de Educação Física e Nutrição, pela estrutura cedida em vários momentos desta pesquisa.

Ao professor João Paulo Viana Leite, pela orientação, pelos ensinamentos, pela amizade e pela confiança.

Ao professor Antônio José Natali pela boa vontade, ajuda expressiva e ensinamentos.

Às professoras Sônia Machado Rocha Ribeiro e Maria do Carmo Gouveia Pelúzio, pela expressiva ajuda, sugestões e pelas informações técnicas sempre oportunas.

À professora Maria Goreti de Almeida Oliveira pelo apoio e motivação na realização deste curso.

À professora Edimar Fontes, pela atenção e disponibilidade em todas as análises estatísticas e pela contribuição na discussão dos resultados.

Aos professores Clovis Andrade Neves e Luciana Moreira Lima, pelo aceite em participar da banca de defesa e pelas expressivas sugestões.

A todos os pesquisadores do Programa de Bioprospecção e Uso Sustentável dos Recursos Naturais da Serra do Brigadeiro (BIOPESP).

Aos amigos Renato e Letícia pelo apoio imprescindível na etapa de coleta das plantas.

Aos amigos do Laboratório de Biodiversidade, Douglas, Carol, Cibele, Alisson,

Amanda, Luciana, pelo feliz convívio, pelo carinho e pela atenção nos momentos de necessidades.

Aos amigos do Laboratório de Bioquímica Animal, Elisa e Anderson, pela amizade e expressiva ajuda em diversas análises.

Aos colegas do Biotério Experimental, Judson, Natália, Juliana, Cíntia, Aurora, Lucas, Samuel, Miguel, Bárbara, Márcia, Karine, Felipe, Vítor e Mateus pela expressiva ajuda na condução de várias etapas do experimento.

Aos funcionários Aécio, Lucinda e Luis Márcio do Departamento de Veterinária, pela enorme ajuda nas análises bioquímicas.

À minha família, principalmente minha mãe Mariana por acreditar em mim.

À querida Tia Eunice pela força e incentivo.

Aos amigos Cacá e Marcos Vinícius pelo carinho e pelos ótimos momentos vividos.

A todos os funcionários do DBB, em especial Eduardo Monteiro, Sr. Geraldo Dias e Jefferson Dias.

Aos funcionários do Biotério Central, em especial Sr. Adão pela atenção e paciência.

A todos os professores, funcionários, amigos e colegas do DBB, que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste curso.

BIOGRAFIA

BRENO CÉSAR VIEIRA, filho de Mariana do Carmo Vieira, nasceu em 4 de julho de 1979, em Itabira, MG.

Em abril de 2000 iniciou o Curso de Educação Física pela Universidade Federal de Viçosa, graduando-se em janeiro de 2004.

Em setembro de 2003 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Fisiologia do Exercício em nível de especialização pela Universidade Veiga de Almeida, concluindo seus estudos em março de 2005.

Em agosto de 2008 iniciou o Curso de Pós-Graduação em Bioquímica Agrícola em nível de mestrado pela Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de bioprospecção de plantas medicinais e exercício.

Em setembro de 2010, se submeteu à defesa de tese para obtenção do título de “*Magister Scientiae*”.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	xii
RESUMO.....	xiii
ABSTRACT.....	xv
1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1. Biodiversidade como fonte de pesquisa para novos fármacos.....	4
2.2. Plantas com atividade adaptógenas.....	4
2.3. Potencial antioxidante das plantas.....	6
2.4. Alterações metabólicas e toxicidade ocasionadas por consumo de extratos vegetais.....	7
2.5. Critério etológico para a seleção de espécies vegetais.....	8
2.5.1. Uso da estratégia etológica pelo programa de bioprospecção do uso sustentável dos recursos naturais da serra do brigadeiro (BioPESB).....	10
2.6. <i>Psychotria vellosiana</i> Benth.....	11
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	13
CAPÍTULO 1	
CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E BROMATOLÓGICA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>Psychotria vellosiana</i> Benth	
1. INTRODUÇÃO.....	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	23
2.1. Obtenção do material vegetal.....	23
2.2. Preparo do extrato vegetal.....	23
2.3. Prospecção fitoquímica preliminar.....	23
2.4. Análise bromatológica.....	24
2.5. Análises de minerais.....	24
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
4. CONCLUSÃO.....	30
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	31
CAPÍTULO 2	
AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO ESTIMULANTE FÍSICO DE EXTRATOS DE FOLHAS DE <i>P. vellosiana</i> Benth EM DE RATOS WISTAR	
1. INTRODUÇÃO.....	35
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	37

2.1. Delineamento experimental.....	37
2.2. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais.....	37
2.3. Animais.....	37
2.4. Protocolo experimental.....	38
2.5. Avaliação da toxicidade de extratos de folhas de <i>P. vellosiana</i>	39
2.5.1. Peso corporal e dos órgãos.....	39
2.5.2. Índice hepatossomático e cardiossomático.....	39
2.5.3. Parâmetros bioquímicos.....	40
2.6. Avaliação do efeito estimulante de extratos de folhas de <i>P. vellosiana</i>	40
2.6.1. Protocolo de exercício.....	40
2.6.1.1. Variável tempo.....	41
2.6.1.2. Variável velocidade.....	41
2.6.1.3. Lactato sanguíneo.....	42
2.7. Análise estatística.....	42
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
3.1. Toxicidade e alteração metabólica de extratos de folhas de <i>P. vellosiana</i>	43
3.1.2. Parâmetros bioquímicos.....	45
3.2. Efeito estimulante de extratos de folhas de <i>P. vellosiana</i>	47
3.2.1. Desempenho físico dos animais.....	48
3.2.2. Variação dos valores de lactato sanguíneo.....	49
4. CONCLUSÃO.....	51
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
CAPÍTULO 3	
POTENCIAL ANTIOXIDANTE <i>IN VITRO</i> DOS EXTRATOS DE <i>Psychotria vellosian</i> Benth E SEUS EFEITOS SOBRE ATIVIDADE DE CATALASE (EC 1.11.1.6)	
1. INTRODUÇÃO.....	56
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	58
2.1. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	58
2.1.1. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais.....	58
2.1.2. Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	58
2.2. Ensaio biológico.....	59
2.2.1. Delineamento experimental.....	59
2.2.2. Local e duração.....	59
2.2.3. Animais.....	60
2.2.4. Protocolo experimental.....	60
2.2.5. Protocolo de exercício.....	61
2.2.6 Atividade da catalase.....	62
2.2.6.1. Dosagem de proteínas totais.....	62
2.3. Análise estatística.....	63
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	65
3.1. Atividade antioxidante <i>in vitro</i>	65

3.2 Efeito dos extratos diclorometânico e etanólico de <i>P vellosiana</i> sobre a atividade de catalase.....	66
3.2.1 Catalase.....	66
4. CONCLUSÃO.....	70
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	71
CONCLUSÕES GERAIS.....	74

LISTA DE TABELAS

	Página
1 Identificação das classes de metabólitos secundários dos extratos diclorometânico e etanol das folhas de <i>P. vellosiana</i>	26
2 Composição centesimal das folhas de <i>P. vellosiana</i>	27
3 Composição mineral das folhas de <i>P. vellosiana</i> e de outras espécies da família rubiáceas.....	28
4 Grupos de animais tratados com extratos diclorometânico e etanólico das folhas de <i>P. vellosiana</i>	38
5 Valores médios do peso corporal final (PCF), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de <i>P. vellosiana</i> após teste de exercício máximo até a exaustão em esteira.....	43
6 Valores médios do índice hepatossomático (IHS) e o índice cardiossomático (ICS) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de <i>P. vellosiana</i> após teste de exercício máximo até a exaustão em esteira.....	44
7 Valores médios dos teores sanguíneos de glicose (GLC), triglicerídeos (TGC), colesterol total (CT), creatinina (CREAT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de ratos tratados com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) de <i>P. vellosiana</i> após teste de exercício máximo até exaustão.....	46

8	Valores médios das variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de exercício máximo até a exaustão em esteira.....	48
9	Valores médios da variação do lactato sanguíneo (Δ LS), de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de <i>P. vellosiana</i> no teste de exercício máximo até exaustão em esteira.....	49
10	Grupos de animais tratados com extratos diclorometânico e etanólico de <i>P. vellosiana</i>	61
11	Valores médios da atividade da catalase hepática de ratos tratados, durante 28 dias, com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de <i>P. vellosiana</i> , após teste de corrida máxima em esteira.....	67
1A	Resumo do PROC GLM para as variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) e variação do lactato sanguíneo (VLS) com diferentes doses de extrato diclorometânico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	75
2A	Resumo do PROC GLM para as variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) e variação do lactato sanguíneo (VLS) com diferentes doses de extrato etanólico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	75
3A	Resumo do PROC GLM para as variáveis de peso corporal total (PCT), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) com diferentes doses de extrato diclorometânico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	75
4A	Resumo do PROC GLM para as variáveis de peso corporal total (PCT), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) com diferentes doses de extrato etanólico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	76
5A	Resumo do PROC GLM para as variáveis glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com diferentes doses de extrato diclorometânico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	77

6A	Resumo do PROC GLM para as variáveis glicose, triglicédeos, colesterol total, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com diferentes doses de extrato etanólico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	77
7A	Resumo do PROC GLM para as variáveis catalase com diferentes doses de extrato diclorometânico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	78
8A	Resumo do PROC GLM para as variáveis catalase com diferentes doses de extrato etanólico de <i>P. vellosiana</i> durante o teste de corrida em esteira.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Potencial antioxidante <i>in vitro</i> pelo método de DPPH. (a) Padrão (BHT) e (b) EEPV.....	66
---	----

RESUMO

VIEIRA, Breno César, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, setembro de 2010. **Análises fitoquímica, bromatológica, toxicológica e dos efeitos estimulante físico e antioxidante de extratos de folhas de *Psychotria vellosiana* Benth.** Orientador: João Paulo Viana Leite. Co-orientadores: Antônio José Natali, Sônia Machado Rocha Ribeiro e Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

O presente trabalho visou às análises química, nutricional e avaliação toxicológica e das atividades estimulante físico e antioxidante de extratos de *Psychotria vellosiana* Benth. Para a prospecção fitoquímica preliminar foi empregada técnica de cromatografia em camada delgada. Na análise nutricional foi realizada a composição centesimal de suas folhas com determinação dos teores de lipídios, carboidratos, proteínas e umidade, assim como dos teores de minerais. As análises toxicológicas e farmacológicas foram realizadas em ratos Wistar. Os animais foram divididos em grupos que, consumiram doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg dos extratos diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de *P. vellosiana*, por um período de 28 dias. Os extratos foram obtidos por percolação exaustiva, sendo concentrados em evaporador rotatório. Na análise toxicológica foram analisados o peso corporal final (PCF), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) dos animais, parâmetros bioquímicos como creatinina, aspartato aminotransferase e alanina aminotransferase. Parâmetros bioquímicos relacionados com possíveis alterações metabólicas como glicose, triglicerídeos e colesterol total, também foram analisados. Para análise farmacológica foi avaliado o efeito estimulante físico (efeito adaptógeno) registrando o desempenho físico dos ratos nas variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA), variação do lactato sanguíneo (Δ LS) no exercício máximo até exaustão de corrida em esteira. Os EDPV e EEPV também foram submetidos à análise antioxidante empregando o teste *in vitro* de DPPH e avaliação *in vivo* de seus efeitos sobre a atividade enzimática da

catalase. Na prospecção fitoquímica foi detectado a presença dos grupos de flavonóides, alcalóides, taninos e cumarinas para EEPV e EDPV. Esteróides/triterpenos foram encontrados somente para o EEPV. A composição centesimal das folhas de *P. vellosiana* revelou considerável valor protéico, além da presença de minerais importantes como cálcio, ferro, fósforo e magnésio. O que ser um indicativo do seu consumo pelos primatas devido ao valor nutricional e a presença de metabólitos secundários. Sobre o desempenho físico e toxicidade, diferentes doses de EEPV e EDPV, não foram verificados melhora significativas no tempo total de corrida (TTC) e velocidade final atingida (VFA). Além disso, as variações do lactato sanguíneo (Δ LS) dos grupos tratados não foram significativamente reduzidas. Não foram verificados sinais de toxicidade dos extratos nas doses testadas nos parâmetros avaliados. A concentração de 13,54 $\mu\text{g/mL}$ do EEPV foi capaz de reduzir a concentração inicial do DPPH em 50% (IC_{50}), valor bem próximo ao BHT (dose de 11, 93 $\mu\text{g/mL}$) indicando forte atividade antioxidante para esse extrato. As doses de 100, 200 e 300 mg/kg de EEPV, reduziram significativamente a atividade da catalase hepática dos ratos em relação ao controle.

ABSTRACT

VIEIRA, Breno César, M.Sc., Universidade Federal de Viçosa, September, 2010. **Phytochemical Analysis, chemical, toxicological and physical stimulant and antioxidant effects of extracts from leaves of *Psychotria vellosiana* Benth.** Adviser: João Paulo Viana Leite. Co-advisers: Antônio José Natali, Sônia Machado Rocha Ribeiro and Maria do Carmo Gouveia Pelúzio.

This work was conducted to analyze chemical and nutritional properties of *Psychotria vellosiana* Benth. Also, toxicological evaluation and physical stimulant capacity and antioxidant activity of its extracts were tested. For the preliminary phytochemical screening was used thin layer chromatography method. In the nutritional analysis were performed the chemical composition of their leaves with determination of lipids, carbohydrates, protein and moisture, as well as the mineral levels. The pharmacological and toxicological analysis was performed in rats. The animals were divided into groups that consumed doses of dichloromethane (EDPV) and ethanol/doses of 100, 200, 300 and 400 mg/ kg (EEPV) leaves of *P. vellosiana* for a period of 28 days. The extracts were obtained by exhaustive percolation, being concentrated in a rotary evaporator. For the toxicological analysis were evaluated the animal's final body weight (CCW), liver weight (FW) and heart weight (BW), biochemical parameters such as creatinine, aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. Biochemical parameters related to metabolic changes such as glucose, triglycerides and total cholesterol were also analyzed. For pharmacological analysis, the effects of physical stimulation (adaptogenic effect) were registered the variables, physical performance of rats in total running time (TTC), final velocity achieved (VFA), changes in blood lactate (Δ LS) at maximal exercise at exhaustion treadmill running. The antioxidant effect of EDPV and EEPV were analyzed using the antioxidant DPPH test *in vitro* and *in vivo* evaluation of their effects on

enzymatic activity of catalase. In the phytochemical analyses were detected groups of flavonoids, alkaloids, tannins and coumarins for EEPV and EDPV. Steroids / triterpenes were found only for EEPV. Chemical composition of leaves of *P. vellosiana* revealed considerable amount of protein, and the presence of important minerals like calcium, iron, phosphorus and magnesium, which may suggest its use by primates due to their nutritional value besides the presence of secondary metabolites. On the effect of different doses of EEPV EDPV on the rats physical performance, no significant improvements were observed in the total race time (TTC) and final speed achieved (VFA). Also, changes in blood lactate (Δ LS) were not significantly reduced in treated groups. There were no signs of toxicity of the extracts at the doses tested in all parameters. The dose of 13.54mg/mL of EEPV was able to reduce the initial concentration of DPPH by 50% (IC50), a value close to BHT (dose of 11, 93mg/ mL) indicating great antioxidant activity for this extract. The doses of 100, 200 and 300 mg/kg of EEPV significantly reduced liver catalase activity when compared to the control.

1. INTRODUÇÃO GERAL

O Brasil é o país de maior diversidade biológica do planeta, apresentando cerca de 20% de toda a biodiversidade da Terra. Sobre essa biodiversidade existe um grande número de espécies de plantas utilizadas com finalidade terapêutica, constituindo instrumento de cura da medicina popular brasileira (JÚNIOR et al., 2005).

Do ponto de vista etnobotânico, como consequência da difusão cultural ocorrida no Brasil desde a chegada dos colonizadores europeus, houve uma grande miscigenação de culturas e rituais de vários grupos étnicos. Essa diversidade cultural, associada à grande biodiversidade, possibilitou uma ampliação e difusão de conhecimentos sobre o uso das plantas medicinais (GIORGETTI et al., 2007).

Os ecossistemas brasileiros estão distribuídos em seis importantes biomas, a saber: Cerrado, Caatinga, Campos sulinos, Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica. Há uma preocupação em estabelecer estratégias de conservação e valorização das espécies endêmicas da flora e fauna existentes nesses diferentes biomas, de forma a utilizá-las de maneira sustentável (MYERS et al., 2000; BRANDON et al., 2005). No entanto, grande parte das espécies vegetais ainda não foi devidamente estudada, sendo desconhecido o potencial farmacológico desses recursos naturais.

Nesse contexto, o desenvolvimento de programas de bioprospecção nesses biomas tem sido apontado como estratégico com o intuito de aproveitar os recursos vegetais para obtenção de produtos não-madeireiros, como os bioprodutos na área de fármacos, cosméticos, alimentos e agroquímicos.

Devido à grande variedade de espécies vegetais existentes na Mata Atlântica (cerca de 20.000 espécies, sendo que 8.000 são consideradas endêmicas), é preciso que se criem estratégias para o acesso e a seleção de espécies vegetais presentes

nesse bioma. É importante ressaltar que várias espécies nativas da floresta Atlântica não fazem parte do elenco de plantas tradicionalmente usadas na medicina popular (MYERS et al., 2000). Surge assim, como estratégia de estudo da biodiversidade, visando à pesquisa de novos fármacos, o emprego da abordagem etológica, que consiste na observação do hábito alimentar de animais que vivem no interior da floresta (KRIEF et al. 2005).

Nessa estratégia de busca de recursos vegetais, empregando-se o critério etológico para se iniciar a investigação farmacológica de plantas, grande atenção tem sido atribuída ao comportamento de primatas. Tal método de estudo se justifica principalmente por dois fatores: primeiro, pelo fato de os primatas serem seres vivos próximos à espécie humana na escala evolutiva. Outro fator refere-se ao elenco de plantas consumidas por esses animais dentro da floresta. Como várias dessas espécies não estão presentes no receituário da medicina popular, tem-se por essa estratégia a possibilidade de seleção plantas que, pelo critério etnofarmacológico, seriam negligenciadas.

Atualmente, a prospecção farmacêutica dos recursos naturais tem possibilitado a descoberta de extratos vegetais e de produtos naturais com atividade biológica de interesse para a saúde humana, permitindo assim o desenvolvimento de novos bioprodutos (CASTRO et al., 2004; JUNIOR et al., 2005). No que diz respeito ao campo esportivo, além do consumo de produtos sintéticos (aminoácidos de cadeia ramificada, creatinina e carnitina), os produtos naturais como extratos de espécies vegetais (*Panax ginseng*, *Eleutherococcus senticosus*) têm sido relacionados à melhora do desempenho físico (DOWLING et al., 1996; BUCCI, 2000; ROBERGS & ROBERTS, 2002; KIM et al., 2005).

Nesse campo, atletas vêm recorrendo a extratos vegetais na busca de melhora de desempenho em exercícios de resistência aeróbica e anaeróbica, de força, assim como na redução do percentual de gordura e melhora na recuperação após exercícios. Além disso, várias ervas são utilizadas com apelo de aumentar a imunidade, tratar lesões, amenizar processos inflamatórios e controlar a dor, otimizando, dessa forma, a saúde e permitindo boas condições de competições para os atletas (BUCCI, 2000). Nesse cenário, alguns estudos com plantas medicinais têm sido direcionados para se avaliar o efeito adaptógeno de extratos vegetais sobre o organismo de animais. Os efeitos adaptógenos ou resistógenos apresentados como características de algumas

plantas medicinais podem ser definidos como a capacidade de aumentar a resistência inespecífica do organismo em situações adversas como estresse, fadiga e doenças (BREKHMANN & DARDYMOV, 1969).

Dentro desse contexto de busca de extratos vegetais oriundos da Mata Atlântica que apresentem ação adaptógena e com potencial uso como estimulante físico em seres humanos, o presente trabalho propõe o estudo da espécie *Psychotria vellosiana* Benth (Rubiaceae). As folhas dessa árvore fazem parte do consumo alimentar de primatas da espécie *Brachyteles hipoxanthus* (muriqui-do-norte), nativos da região de Mata Atlântica. O consumo das folhas de *P. vellosiana* pelo primata foi registrado e catalogado no banco de dados sobre bioprospecção farmacêutica do grupo de pesquisa BioPESB-UFV (Bioprospecção e Uso Sustentável dos Recursos Naturais da Serra do Brigadeiro). Para a seleção dessa espécie, visando à busca de produtos naturais com ação estimulante físico, também foi levado em consideração o critério quimiotaxonômico, uma vez que existem vários relatos científicos de espécies da família Rubiaceae e do gênero *Psychotria* como sendo biossintetizadores de metabólitos secundários com essa atividade (VAN DE SANTOS et al., 2001; FARIAS, 2006). O fato de a planta ser consumida por primata pode ser um forte indício de ausência de toxicidade para humanos, uma vez que há grande similaridade biológica entre primatas não-humanos e humanos, ambos pertencentes à ordem primata e a sub-ordem Anthrooidea.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Biodiversidade como fonte de pesquisa para novos fármacos

O Brasil apresenta uma grande diversidade biológica de seres vivos, inclusive de plantas com relato popular e científico de propriedades medicinais. Grande parte dessa biodiversidade está relacionada às espécies nativas e exóticas, sendo estas introduzidas na flora brasileira a partir do processo de colonização em 1500 (BRANDÃO et al., 2008).

A biodiversidade vegetal contribui muito para o acesso e desenvolvimento de novos fármacos. Há uma estimativa de que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual sejam provenientes de produtos naturais, sendo que as espécies vegetais contribuem com 25% do total dessa parcela, enquanto microorganismos e animais com 13% e 3% respectivamente. (CALIXTO, 2003).

São inúmeros os medicamentos obtidos a partir de extratos vegetais e de compostos bioativos naturais isolados de plantas medicinais, podendo estes realizar várias atividades no tratamento e prevenção de doenças. Dentre as atividades já relatadas para esses produtos, podem ser citadas a antibacteriana, antitumoral, antiinflamatória, imunossupressora e analgésica (YOUNES et al., 2007; HARVEY, 2008; PERUMAL & GOPALAKRISHNAKONE, 2008). Dentre os produtos naturais bioativos com grande aplicabilidade na medicina está a morfina, um alcalóide isolado da *Papaver somniferum*, cuja estrutura química serviu de protótipo para gerar uma classe de medicamentos com ação hipoanalgésico (BARREIRO & BOLZANI, 2009).

2.2 Plantas com atividade adaptógena

A definição clássica do termo fadiga é a incapacidade do músculo esquelético de gerar e manter níveis de força muscular durante a realização de exercícios (ENOKA & STUART, 1992). Uma definição semelhante sobre fadiga, porém mais recente, foi elaborada por Power & Howley (2000) como incapacidade de manter a produção de potência ou força, durante o processo de contrações musculares repetitivas.

Relacionando o conceito de fadiga ao potencial farmacológico de espécies vegetais, os efeitos estimulantes físicos de extratos vegetais podem ser agrupados dentro da categoria terapêutica chamada “adaptógeno”. Os efeitos adaptógenos ou resistógenos apresentados como características de algumas plantas medicinais podem ser definidos como a capacidade de aumentar a resistência inespecífica do organismo em situações adversas como estresse, doenças e fadiga (BREKHMANN & DARDYMOV, 1969). Além dessas características, a classificação das plantas medicinais em adaptógenas leva em consideração a capacidade de suas propriedades estimulantes ou psicoanalépticas de atuarem sob mediadores do sistema nervoso central (SNC) (CARLINI, 2003).

Ao realizarem uma revisão a partir de livros brasileiros, sobre a utilização de plantas empregadas na medicina popular, MENDES & CARLINI (2007) relataram que, de 33 espécies citadas em pelo menos quatro livros, apenas quatro espécies tinham relato de efeito adaptógeno. Estas espécies foram: *Heteropterys aphrodisiaca* (Malpighiaceae), *Turnera diffusa* (Turneraceae), *Ptychopetalum olacoides* (Olacaceae) e *Paullinia cupana* (Sapindaceae).

Diante do perfil farmacológico de drogas vegetais com ação adaptógena, suas características mais importantes são a capacidade de aumentar a resistência dos animais à exaustão física e outras tensões como baixas e altas temperaturas, alteração da pressão atmosférica e do teor de oxigênio disponível, imobilização, radiação, drogas tóxicas, produtos químicos, ruídos, fome, medo, ansiedade e doenças crônicas (PANOSSIAN & WIKMAN, 2005).

Ao avaliar o efeito adaptógeno de extratos vegetais sobre a resistência ao estresse, alguns parâmetros (velocidade e tempo atingido) relacionados aos testes de desempenho físico, de característica dinâmica, são importantes (PANOSSIAN & WIKMAN, 2005). Têm-se utilizado ratos e camundongos em estados de

hipoglicemia, baixo nível de cortisol e submetidos ao exercício físico exaustivo. Essas condições têm como objetivo avaliar a capacidade de extratos vegetais em contribuir para a recuperação orgânica dos animais após situações de estresse para o organismo (BHATTACHARYA & MURUGANANDAM, 2003; KANNUR et al., 2006). Ao se investigar o efeito adaptógeno de extratos vegetais em modelo *in vivo* que avalia o desempenho de ratos submetidos ao exercício de natação, alguns parâmetros bioquímicos foram monitorados, como glicogênio muscular e hepático, amônia, glicose, lactato, triacilglicerol e nível sérico de nitrogênio na uréia (JUNG et al., 2004; KANNUR et al., 2006; JUNG et al., 2007; LI et al., 2008).

Empregando-se esse modelo, extratos de diferentes espécies vegetais, como *Caesalpinia bonduc*, *Cordyceps militaris*, *Paecilomyces japonica*, *Phellinus linteus*, *Ganoderma lucidum*, *Grifola frondosa*, *Panax ginseng*, *Rubus coreanus*, *Cyperus rotundus*, *Acanthopanax sessiliflorus*, *Saururus chinensis*, *Epimedium koreanum* e *Houttuynia cordata*, apresentaram aumento significativo do tempo de natação. Aumento significativo dos níveis de glicose e redução dos níveis de lactato, triglicerídeos e amônia, também foram observados (JUNG et al., 2004; KANNUR et al., 2006; JUNG et al., 2007; LI et al., 2008).

A carência de estudos científicos sobre os possíveis efeitos de produtos de origem vegetal sobre o desempenho físico desperta para a necessidade de pesquisas focadas na avaliação desses efeitos.

2.3. Potencial antioxidante das plantas

Espécies oxidativas reativas (EROs) abrange principalmente espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio possuindo algumas funções no meio biológico, como por exemplo, a utilização das EROs por células fagocíticas contra bactérias e vírus, além da função sinalizadora em eventos celulares importantes. No entanto, quando ocorre um aumento da produção de EROs associado à redução da capacidade celular de eliminá-los via mecanismos antioxidante endógenos, ocorre o que chamamos de estresse oxidativo. Esse evento pode induzir a danos em membranas celulares causados por reações das EROs com lipídios e proteínas, alterando o equilíbrio celular e, conseqüentemente, as funções dos tecidos (RIBEIRO et al., 2008).

Um dos mecanismos de proteção do organismo contra os efeitos deletérios causados pelas EROs nas células pode ser o mecanismo não-enzimático. Esse mecanismo é constituído por grande número de composto de baixo peso molecular, ingeridos pela dieta ou sintetizados no organismo e que possuem função de eliminar os radicais livres, sendo denominados redutores ou antioxidantes biológicos (RIBEIRO et al., 2008). O potencial biológico das plantas medicinais vem contribuindo muito para o mecanismo antioxidante não-enzimático, sendo que há um número grande de relatos científicos da avaliação antioxidante dos extratos de espécies vegetais. Além disso, compostos fenólicos presentes em plantas têm sido apontados como um dos principais grupos de metabólitos secundários responsáveis pelo potencial antioxidante (FARIAS, 2006).

O potencial antioxidante de diversas espécies vegetais tem sido encontrado para extratos obtidos a partir de diferentes farmacógenos, como folha, raiz, caule, casca e fruto. Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos obtidos a partir desses farmacógenos podem ser empregados modelos *in vitro*, através dos métodos de sequestro do radical livre, DPPH (1,1-difenil- 2-picrilhidrazina) e ABTS [2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)], e *in vivo*, pela análise enzimática da catalase e superóxido dismutase em tecidos como rins, fígado, cérebro, coração e soro (PRADO et al., 2009; LIMA et al., 2007).

2.4. Alterações metabólicas e toxicidade ocasionadas por consumo de extratos vegetais

Mundialmente, tem ocorrido um crescimento do consumo de produtos naturais, principalmente a base de extratos vegetais, com o propósito de tratamento e profilaxia de doenças. No entanto, paralelamente ao crescimento da automedicação a base de produtos naturais, observa-se, também, um crescimento da preocupação com a eficácia e segurança destes produtos para a saúde da população (JUNIOR et al., 2005). No estudo de desenvolvimento de um novo fármaco a partir de extratos vegetais, faz-se fundamental a realização de pesquisas pré-clínicas, envolvendo análise de parâmetros bioquímicos relacionados com toxicidade e alterações metabólicas dos extratos, de forma a garantir a segurança desses extratos (MUKINDA & SYCE, 2007; CUNHA et al., 2009; MUKINDA & EAGLE, 2010).

A avaliação da toxicidade *in vivo* desenvolvida em estudos científicos tem utilizado como indicativo do efeito tóxico alterações ocorridas nos valores dos parâmetros bioquímicos como creatinina, alaninoaminotransferase (ALT) e aspartatoaminotransferase (AST), além da relação do peso dos órgãos pelo peso corporal total dos animais. Já as alterações metabólicas podem ser identificadas a partir das alterações de parâmetros bioquímicos como glicose, colesterol total e triglicérides (MUKINDA & SYCE, 2007; CUNHA et al., 2009; MUKINDA & EAGLE, 2010).

Sobre a toxicidade de extrato vegetal, Maphosa et al. (2010) relatam que, após tratamento de 14 dias utilizando o extrato aquoso da raiz de *Elephantorrhiza elephantina* nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg, foram observadas poucas alterações entre os parâmetros bioquímicos séricos (creatinina, AST, ALT) e macroscópicos relacionados ao peso vivo e de órgãos como rim, fígado, intestino e baço de ratos Wistar. Apenas os valores de creatinina e o peso do fígado apresentaram aumentos significativos ($p < 0,05$) para os animais que receberam as doses de 400 e 800 mg/kg em relação ao grupo controle. Estes resultados indicaram que apenas as doses de 400 e 800 mg/kg de extrato aquoso da raiz de *Elephantorrhiza elephantina* foram tóxicas.

2.5. Critério etológico para a seleção de espécies vegetais

No processo de acesso e de seleção dos recursos vegetais com o intuito de realizar estudos científicos para a descoberta de novos fármacos podem ser utilizadas diferentes estratégias. A estratégia etnofarmacológica consiste em realizar uma investigação das plantas utilizadas na medicina popular de comunidades locais; enquanto a quimiotaxonômica consiste na seleção de espécie de determinada família ou gênero botânico que se tenham informações fitoquímica e ou farmacológica de ao menos outro representante do mesmo grupo taxonômico. Na estratégia randômica realiza-se uma coleta aleatória de plantas para a triagem fitoquímica e farmacológica. Por outro lado, a estratégia etológica tem como ponto de partida a observação da relação dos animais com as plantas do ambiente, investigando aquelas presentes em suas dietas (MOREIRA et al., 2002; AMOROZO, 2002; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Em biomas de grande variedade de espécies vegetais endêmicas, como na

Mata Atlântica, diversas plantas não fazem parte do arsenal terapêutico da medicina popular das comunidades locais, as quais passaram a incorporar em seu receituário caseiro espécies vegetais exóticas. No Brasil, esse cenário pode ser justificado pelo próprio processo de colonização de várias regiões, em que os imigrantes trouxeram juntamente com a sua sabedoria popular relacionado aos chás, sementes e mudas de plantas do seu país de origem (LEITE et al., 2008). Nesse caso, faz-se necessária a busca de métodos alternativos para o acesso ao patrimônio genético de interesse do campo farmacêutico. Em alguns casos, o critério etológico, monitorado pela observação do hábito alimentar de animais nativos, pode representar uma importante estratégia para a seleção de plantas para ser investigado quanto ao potencial farmacológico.

No âmbito internacional, a estratégia etológica tem sido utilizada por vários estudos de bioprospecção farmacêutica (HUFFMAN, 2001; 2003; CARRAI et al., 2003; KRIEF et al, 2004; 2005), e os resultados demonstram que esta via de investigação tem sido eficiente para o acesso aos recursos vegetais com potencial terapêutico. Como exemplos de monitoramento do hábito animal visando a seleção de plantas para estudos de bioprospecção, pode-se citar o estudo realizado por CARRAI et al. (2003), ao observar que as sifakas (*Verreaux propithecus*) aumentaram o consumo de espécies vegetais ricas em taninos durante o período de gestação. A seletividade da planta e a presença de hábitos incomuns sugerem que este pode ser um comportamento auto-medicamentoso. Estas espécies de primatas tem seu habitat na floresta Kindy em Madagascar. Os estudos fitoquímicos e farmacológicos de folhas de *Trichilia rubesce* consumidas por chimpanzés de Uganda, região endêmica de malária, possibilitaram a confirmação da hipótese de que essa espécie possui metabólitos secundários com atividade antimalárica (KRIEF et al., 2004).

Outro estudo sobre a abordagem etológica foi realizado por KRIEF et al. (2005). Foi feito um levantamento de espécies vegetais que fazem parte da dieta de chimpanzés Kanyawara no Parque Nacional Kibale, em Uganda, relacionando-as ao estado de saúde dos primatas. Das espécies vegetais levantadas, apenas 21% apresentaram relatos na medicina tradicional para o tratamento de doenças parasitárias, infecções cutâneas, reprodução e patologias respiratórias. Nesse estudo, critérios metodológicos como seleção de espécies vegetais com baixo valor

nutricional, frequência de consumo das plantas pelos primatas, associado ao cauteloso levantamento bibliográfico dos dados etnomedicinais em fontes bibliográficas, apresentaram-se como pontos fundamentais para o desenvolvimento de pesquisas adotando a estratégia etológica. Segundo esses autores, fatores como a pequena porcentagem de investigação sistemática de plantas consumidas pelos primatas quanto à presença de compostos bioativos e a proximidade taxonômica entre os primatas e seres humanos justificam a eficácia da estratégia etológica para a busca de novos fármacos.

2.5.1. Uso da estratégia etológica pelo programa de bioprospecção do uso sustentável dos recursos naturais da Serra do Brigadeiro (BioPESB)

O bioma de Mata Atlântica brasileira representa uma das principais áreas de megabiodiversidade do planeta, com presença de várias espécies vegetais endêmicas, revelando, assim, um grande potencial para a busca de novos princípios ativos a partir de fontes vegetais.

Sendo reconhecido como importante área remanescente de Mata Atlântica, o Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), localizado na região da Zona da Mata do estado de Minas Gerais, ainda conserva grande patrimônio genético. Sua vegetação apresenta características ombrófilas, com ocorrência de campos de altitude nas áreas mais elevadas. Os solos são pobres em nutrientes e possuem alto teor de alumínio, podendo apresentar elevados teores de matéria orgânica (IEF, 2007).

No PESB, espécies de primatas como o sagui (*Caullithrix aurita*), sauaú (*Callicebus nigriro*), macaco prego (*Cebus nigritus*), barbado (*Allouatta guariba clamita*) e miqui-do-norte (*Brachyteles hipoxanthus*) foram identificadas pela ocorrência de registros diretos e indiretos. O PESB abriga espécies de primatas com hábito vegetariano como *Brachyteles hipoxanthus* Kuhl (miqui-do-norte), que têm sido focalizados em diversos estudos desenvolvidos na região (FÁVARO, 2008; MOREIRA, 2008).

Pesquisadores do BioPESB realizaram levantamento investigando as espécies de plantas consumidas por miquis-do-norte (*Brachyteles hipoxanthus* Kuhl) no bioma de Mata Atlântica do PESB. Este levantamento teve o objetivo de diagnosticar o número de estudos químicos e farmacológicos existente sobre as espécies vegetais

consumidas pelos primatas, além de construir um banco de dados das espécies vegetais a serem utilizadas no estudo de bioprospecção farmacêutica. No primeiro levantamento realizado os autores descreveram 11 espécies vegetais consumidas pelos primatas: *Alchornea triplinervia*, *Sapium glandulatum*, *Allophylus edulis*, *Amaioua guinesis*, *Miconia latecrinata*, *Nectandra oppsitifolia*, *Ocotea odorifera*, *Rapanea ferruginea*, *Solanum cinnamomum*, *Solanum leucodendrum* e *Psychotria vellosiana*. Dessas espécies, apenas 27% apresentavam estudos relacionados à constituição química ou ação farmacológica, ou seja, das 73% de espécies consumidas pelo *Brachytelis hipoxanthus* não existe qualquer estudo ligado à prospecção farmacêutica (GONTIJO et al., 2007).

Na mesma linha de estudo, o segundo levantamento da variedade de espécies de plantas que fazem parte da dieta de *B. hipoxanthus* foi realizado no PESB pelo método de varredura instantânea (Scan Sampling). Este método permitiu observar a atividade de vários indivíduos a cada intervalo de amostragem, sendo observada apenas a atividade de forrageamento, que consistiu na procura e ingestão de alimentos pelos primatas. Ao total, 29 espécies distribuídas em 26 gêneros e pertencentes a 18 famílias foram identificadas como consumidas pelos primatas, incluindo a espécie *Psychotria vellosiana* (FÁVARO, 2008).

Os resultados têm contribuído muito para demonstrar a eficiência da estratégia etológica ao confrontar os dados obtidos com a estratégia etnofarmacológica, em estudo que englobam o fragmento da mesma área (PESB). Do total de 29 espécies vegetais que fazem parte da dieta dos muriquis 72,4% não apresentaram relatos de estudos fitoquímicos e 75,9% não apresentaram relatos de estudos farmacológicos. Cerca de 60% dessas plantas têm o potencial farmacológico completamente desconhecido e 82,8% não tem relato de uso na medicina popular e foram negligenciadas pelo critério etnofarmacológico. Já pela estratégia etnofarmacológica foram identificadas 66 espécies vegetais utilizadas pela medicina popular de comunidades do entorno do PESB, sendo que 69,9% apresentam estudos fitoquímicos e 71% apresentam estudos farmacológicos (LEITE, 2007). A estratégia etológica possibilitou o acesso a um maior número de espécies vegetais nativas com ausência de estudos do que pela estratégia etnofarmacológica. Todas as espécies vegetais consumidas pelo primata foram identificadas como endêmicas enquanto pela estratégia etnofarmacológica 59,4% foram exóticas. Esses resultados despertam

para a importância da abordagem etológica para a seleção e desenvolvimento de estudos de espécies vegetais endêmicas com características fitoquímica e farmacológica desconhecidas.

2.6. *Psychotria vellosiana* Benth

A *Psychotria vellosiana* (Rubiaceae) está classificada botanicamente na mesma família da *Coffea arabica* (café), que possui a cafeína, uma trimetilxantina com fortes evidências ergogênicas. Dentre os diversos efeitos ergogênicos da cafeína, destacam-se a melhora de desempenho em exercícios de resistência de intensidade submáxima, assim como o seu efeito estimulante sobre o SNC, aumentando a liberação de catecolaminas e também do processo de lipólise (SCHWENK & COSTLEY, 2002; MAGKROS & KAVOURAS, 2004; CIOCCA, 2005; KEISLER & ARMSEY, 2006; LATTAVO et al., 2007).

Estudos com as folhas da espécie *Psychotria umbellata* indicaram a presença de alcalóides indólicos monoterpênicos (MIAs), apresentando atividade protetora contra o estresse oxidativo em leveduras, agindo simultaneamente como agente antioxidante e antimutagênico (FRAGOSO et al., 2008). A avaliação química das folhas de *Psychotria umbellata* levou à identificação de quatro alcalóides pertencentes ao grupo dos indólicos monoterpênicos glicosilados, sendo a psicolatina a principal substância identificada (PASSOS, 2008).

Alguns alcalóides têm demonstrado efeito analgésico, ansiolítico, antidepressivo, antipsicótico e efeito amnésico por meio da modulação de receptores opióides, glutamatérgicos NMDA e serotoninérgicos 5-HT_{2A/C} (BOTH et al., 2005; BOTH et al., 2006; PASQUALI et al., 2006).

Não foram encontrados relatos na literatura de estudos fitoquímicos e farmacológicos da *P. vellosiana*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, U.P; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 (Supl.), p.678-689, 2006.
- AMOROZO, M.C.M. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Leverger, M.T., Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v.16, n.2, p.189-203, 2002.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n.3, p.679-688, 2009.
- BHATTACHARYA, S.K; MURUGANANDAM, A.V. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.547-555, 2003.
- BOTH, F.L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V.A.; HENRIQUES, A.T.; ELISABETSKY, E.J. Psychopharmacological profile of the alkaloid psychollatine as a 5HT2A/C serotonin modulator. **Journal of Natural Products**, v.68, n.3, p. 374-380, 2005.
- BOTH, F.L.; MENEGHINI, L.; KERBER, V.A.; HENRIQUES, A.T.; ELISABETSKY, E.J. Role of glutamate and dopamine receptors in the psychopharmacological profile of the indole alkaloid psychollatine. **Journal of Natural Products**, v.69, n.3, p.342-345, 2006.
- BRANDÃO, M.G.L; ZANETTI, M.N.S; OLIVEIRA, P; GRAEL, C.F.F; SANTOS, A.C.P; MONTE -MÓR, L.R.M. Brazilian medicinal plants described by 19th century European naturalists and in the Official Pharmacopoeia. **Journal of Ethnopharmacology**, v.120, n.2, p.141-148, 2008.
- BRANDON, K; FOECA, G.A.B; RYLANDS, A.B; SILVA, J.M.C. Conservação Brasileira: desafios e oportunidades. **Revista Megadiversidade**, v.1, n.1, p.7-13, 2005.
- BREKHMANN, I.I; DARDYMOV, I.V. New substances of plants origin which increase nonspecific resistance. **Annual Reviews Pharmacology**, v.9, p.419-430, 1969.

- BUCCI, L.R. Selected herbals and human exercise performance. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.72, n.2, p.624S-636S, 2000.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciencia e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39, 2003.
- CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.501-512, 2003.
- CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S.M.; HUFFMAN, M.A.; BARDI, M. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self-medication in prosimians? **Primates**, v.44, n.1, p.61-66, 2003.
- CASTRO, H.G; FERREIRA, F.A.; SILVA, D.J.H.; MOSQUIM, P.R **Contribuição aos estudos de plantas medicinais - metabolismo secundário**. 2.ed. Visconde do Rio Branco: Suprema, 2004, 113p.
- CIOCCA, M. Medication and supplement use by athletes. **Clinics in Sports Medicine**, v.24, n.3, p.719-738, 2005.
- CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS H.O. G.; SENA, A. A. S.; JUNIOR, R.S.L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2A, p.403-411, 2009.
- DOWLING, E.A; REDONDO, P.R; BRANCH, J.D; JONES, S; McNABB, G; WILLIA, M.H. Effects of *Eleutherococcus senticosus* on submaximal and maximal exercise performance. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, v.28, n.4, p.482-489, 1996.
- ENOKA, R.M; STUART, D.G. Neurobiology of muscle fatigue. **Journal of Applied Physiology**, v.5, n.72, p.1631-1648, 1992.
- FARIAS, F.M. ***Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiquimiotóxica e sobre o sistema nervoso central**. Porto Alegre, RS.: UFRGS, 2006, 191p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- FÁVARO, L.B. **Influência da estrutura florestal na área de vida do miquiqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG**. Lavras, M.G.: UFLA, 2008, 44p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, 2008.
- FRAGOSO, V; NASCIMENTO, N.C; MOURA, D.J; SILVA, A.C.R; RICHTER, M.F; SAFFI, J; FETT-NETO, A.G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v.22, n.3, p.559-566, 2008.

- GIORGETTI, M; NEGRI, G; RODRIGUES, E. Brazilian plants with possible action on the central nervous system - A study of historical sources from the 16th to 19th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.2, p.338-347, 2007.
- GONTIJO, D.C; FÁVARO, L.B; JÚNIOR, W.M.S; MAIA, R.T; MOREIRA, L.S; VIANA, J.P.L. Abordagem etológica na busca de compostos naturais bioativos no parque estadual da serra do brigadeiro. **In: V Simpósio de Extensão Universitária**, Viçosa, 2007.
- HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v.13, n.19-20, p.894-901, 2008.
- HUFFMAN, M.A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.62, n.2, p.371-381, 2003.
- HUFFMAN, M.A. Self-medicative behaviour in the African Great: an evolutionary perspective into the origins of human traditional medicine. **BioScience**, v.51, n.8, p.651-661, 2001.
- INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAL (IEF). Plano de manejo do Parque Estadual da serra do Brigadeiro, Minas Gerais, 2007.
- JUNG, K.A; HAN, D; KWON; E.K; LEE, C.H; KIM, Y.E. Antifatigue effect of *Rubus coreanus* Miquel extract in mice. **Journal of Medicinal Food**, v.10, n.4, p.689-693, 2007.
- JUNG, K; KIM, I.H; HAN, D. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.75-81, 2004.
- JÚNIOR, A.A.A; LOPES, R.C; ARMOND C; SILVA F; CASALI, V.W.D. **Folhas de Chá - Plantas Medicinais na Terapêutica Humana**. 1.ed. Viçosa: UFV, 2005, 233p.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- KANNUR, D.M.; HUKKERI, V.I.; AKKI, K.S. Adaptogenic activity of *Caesalpinia bonduc* seed extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.3, p.327-331, 2006.
- KEISLER, B.D.; ARMSEY, T.D. Caffeine as an ergogenic aid. **Current Sports Medicine Reports**, v.5, n.4, p. 215-219, 2006.
- KIM, S.H; PARK, K.S; CHANQ, M.J; SUNQ, J.H. Effects of *Panax ginseng* extract on exercise -induced oxidative stress. **Journal Medicine and Physical Fitness**, v.45, n.2, p.178-182, 2005.

- KRIEF, S.; MARTIN, M.T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p.3196-3199, 2004.
- KRIEF, S; HLADIK, C.M; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology** , v.101, n.1-3, p.1-15, 2005.
- LATTAVO, A; KOPPERUD, A.; ROGERS, P.D. Creatine and other supplements. **Pediatric Clinics of North America**, v.54, n.4, p.735-760, 2007.
- LEITE, J.P.V. Abordagem Etológica na Busca de Compostos Naturais Bioativos no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. In: **V SIMPÓSIO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA**, Viçosa. 2007.
- LEITE, J.P.V.; FERNANDES, J.M.; FÁVARO, L.B.; GONTIJO, D.C.; MAROTTA, C.P.B.; SIQUEIRA, L.C.; MAIA, R.T.; GARCIA, F.C.P. Plantas medicinais do entorno do Parque Estadual da Serra do Brigadeiro. **MG Biota**, v.1, n.4, p.16-34, 2008.
- LI, M; DONGLIAN, C; HUAIXING, L; BENDE, T; LIHUA, S; YING, W. Anti-fatigue effects of salidroside in mice. **Journal of Medical Colleges of PLA**, v.23, n.2, p.88-93, 2008.
- LIMA, M.M.O.; VIEIRA, L.F.; COSTA JUNIOR, J.S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia iignis* Mart. (Clusiaceae). In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007, João Pessoa. **Resumos...** João Pessoa: 2007. p.1-6.
- MAGKROS, F.; KAVOURAS, S. A. Caffeine and ephedrine: physiological, metabolic and performance-enhancing effects. **Sports Medicine**, v.34, n.13, p.871-889, 2004.
- MAPHOSA, V.; MASIKA, P.J.; MOYO, B. Toxicity evaluation of the aqueous extract of the rhizome of *Elephantorrhiza elephantina* (Burch.) Skeels. (Fabaceae), in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, n.1, p.196-201, 2010.
- MENDES, F.R; CARLINI, E.A. Brazilian plants as possible adaptogens: An ethnopharmacological survey of books edited in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n.3, p.493-500, 2007.
- MOREIRA, L.S; **Socioecologia de Muriquis-do-norte (*Brachitelys hipoxantus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, MG**. Viçosa, M.G.: UFV, 2008, 94p. Dissertação (Mestrado em Biologia Animal) - Universidade Federal de Viçosa, 2008.
- MOREIRA, R.C.T; COSTA, L.C.B; COSTA, R.C.S; ROCHA, E.A. Abordagem etnobotânica acerca do uso de plantas medicinais na vila cachoeira, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v.21, n.3, p. 205-211, 2002.

- MUKINDA, J.T.; EAGLES, P.F.K. Acute and sub-chronic oral toxicity profiles of the aqueous extract of *Polygala fruticosa* in female mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.128, n.1, p. 236–240, 2010.
- MUKINDA, J.T.; SYCE, J.A. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v.112, n.1, p.138–144, 2007.
- MYERS, N; MITTERMEIER, R.A; MITTERMEIER, C.G; FONSECA, G.A.B; KENTS, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p.853-858, 2000.
- PANOSSIAN, A; WIKMAN, G. Effect of adaptogens on the central nervous system. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, v.3, n.1, p.29-51, 2005.
- PASQUALI, G., PORTO, D.D., FETT-NETO, A.G. Metabolic engineering of cell cultures versus whole plant complexity in production of bioactive monoterpene indole alkaloids: recent progress related to old dilemma. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.101, n.4, p.287-296, 2006.
- PASSOS, C.S. **Psicolatina: caracterização conformacional e avaliação do efeito sobre os níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios em regiões cerebrais de roedores**. Porto Alegre, RS.: UFRGS, 2008, 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- PERUMAL, R.S.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v.7, n.3, p.283-294, 2008.
- POWERS, S. K; HOWLEY, E.T. Fisiologia do exercício. Teoria e aplicação ao condicionamento e ao desempenho. 3 ed. Ed. Manole; p. 361-370; 2000.
- PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.4, p.323-332, 2009.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, M.E.L.R.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, J.H. Antioxidantes da dieta. In: COSTA, N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. (Eds.) **Nutrição Básica e Metabolismo**. 1.ed. Viçosa: UFV, p.382-400, 2008.
- ROBERGS, R.A; ROBERTS, S.O. Recursos ergogênicos. **In: Princípios fundamentais de fisiologia do exercício para aptidão, desempenho e saúde**. 1.ed. São Paulo: Phorte, 2002. 489p.
- SCHWENK, T.L; COSTLEY, C.D. When food becomes drug: nonanabolic nutritional supplement use in athletes. **The American Journal of Sports Medicine**, v.30, n.6, p.907-916, 2002.

VAN DE SANTOS, L.; FETT-NETO, A.G; KEBER, V.A; ELISABETSKY, E; QUIRION, J.C; HENRIQUES, A.T. Indole monoterpene alkaloids from leaves of *Psychotria suterella* Müll. Arg. (Rubiaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.29, n.11, p.1185-1187, 2001.

YOUNES, R. N.; VARELLA, A. D., SUFFREDINI, I. B. Discovery of new antitumoral and antibacterial drugs from brazilian plant extracts using high throughput screening. **Clinics**. v.62, n.6, p.763-768, 2007.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E BROMATOLÓGICA DOS EXTRATOS DE FOLHAS DE *PSYCHOTRIA VELLOSIANA* BENTH

1. INTRODUÇÃO

O processo de evolução e competição entre as espécies vegetais surge como resultado da adaptação destas ao ambiente e induz a biossíntese de várias classes de metabólitos secundários. Entre estas podemos citar flavonóides, alcalóides, cumarinas, cardiotônicos, taninos, antraquinonas e esteróides/triterpenos, tendo já sido relatadas várias atividades farmacológicas associadas a esses metabólitos (ALVES, 2001). O Brasil é um país com grande diversidade biológica, possuindo entre 15 e 20% de todas as espécies de plantas terrestres conhecidas no planeta (LEWINSOHN & PRADO, 2002). Muitas dessas espécies vegetais ainda não tiveram o seu potencial biológico avaliado. O propósito em estudos de identificação de princípios ativos em plantas e de avaliação de suas atividades biológicas tem sido direcionado para o tratamento e profilaxia de diversas enfermidades, na busca de novos medicamentos (GAZDA, 2004).

Atualmente o acesso ao elenco da diversidade vegetal tem sido abordado por meio de diferentes estratégias: randômica, quimiotaxonômica, etnofarmacológica e etológica. Sobre a estratégia etológica, o monitoramento do comportamento de primatas e o estudo de plantas que fazem parte da dieta dos primatas têm contribuído para o acesso às espécies vegetais com potencial biológico. A partir do acesso às espécies vegetais desconhecidas é possível produzir extratos, identificar metabólitos secundários e avaliar atividades biológicas (HUFFMAN, 2001; 2003; CARRAI et al, 2003; KRIEF et al, 2004; 2005).

Ao utilizar a estratégia etológica para o acesso e desenvolvimento de estudos científicos de plantas com potencial fitoquímico e farmacológico desconhecido faz-se importante avaliar também, os aspectos inerentes a sua composição nutricional, ou seja, de macronutrientes e micronutrientes. Nesse caso, a constatação de baixo valor energético e nutritivo de determinada planta que faz parte da dieta de primatas não

humanos pode sugerir o consumo da mesma pelo animal devido a propriedades medicinais (MILTON, 1999; 2000; 2003).

Sobre os valores nutricionais de espécies vegetais que fazem parte da dieta de primatas não-humanos, não há estudos precisos que determinem os valores de ingestão recomendados e nutrientes para primatas. No entanto, o monitoramento da dieta, aliado às análises nutricionais das plantas que a compõem, possibilitou observar que a quantidade estimada de alguns minerais consumidos por primatas não-humanos é superior ao recomendado para humanos adultos (MILTON, 1999; 2000; 2003).

Estudos realizados no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro, no estado de Minas Gerais, Brasil, vêm contribuindo para reforçar a importância da estratégia etológica como ferramenta de pesquisa para acesso às espécies vegetais com potencial medicinal. De um total de 29 espécies vegetais identificadas, distribuídas em 16 famílias botânicas e que estão inclusas na dieta do primata *Brachyteles hipoxanthus*, verificou-se que para grande parte ainda não existe relato de estudos científicos (GONTIJO et al., 2007; FÁVARO, 2008). Entre essas espécies vegetais consumidas pelos primatas e alvo de estudo do presente trabalho está a *Psychotria vellosiana* (Rubiaceae).

A família Rubiaceae compreende 650 gêneros e mais de 13.000 espécies de hábitos essencialmente tropicais, representando uma das maiores famílias entre as angiospermas. No Brasil, existe uma ampla distribuição de espécies de Rubiaceae nos biomas Amazônia, Cerrado e Mata Atlântica (BOLZANI et al., 2001). Estudos fitoquímicos com a família Rubiaceae revelaram uma grande variedade de metabólitos secundários, tais como alcalóides, (HENRIQUES et al., 2004), antraquinonas (LING et al., 2002), flavonóides triterpenos, cumarinas (LUCIANO et al., 2004), revelando um grande potencial biológico.

Sobre o gênero *Psychotria*, PASSOS (2008), com propósito de buscar novos fármacos, avaliou a composição química das folhas de *P. umbellata*, identificando a presença de quatro alcalóides pertencentes ao grupo dos indol monoterpênicos glicosilados, sendo a psicolatina a principal substância identificada. Outro estudo com a mesma espécie direcionou seus objetivos para avaliar as atividades biológicas desta espécie e revelou que a planta possui atividade antioxidante e antimutagênica (FRAGOSO et al., 2008).

Empregando-se a estratégia etológica para busca de novos compostos bioativos e considerando a ausência de dados científicos sobre perfil fitoquímico e a composição nutricional de *P. vellosiana*, o presente estudo buscou a obtenção dessas informações sobre as folhas da espécie.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Obtenção do material vegetal

Amostras de folhas frescas (4775g) do vegetal *P. vellosiana* foram coletadas em área de fragmento de Mata Atlântica no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro (PESB), município de Araponga, Minas Gerais. A licença para a coleta foi solicitada e autorizada pelo Instituto Estadual de Floresta (IEF) de Minas Gerais. Após a coleta do material vegetal, as amostras foram secas em estufa ventilada com temperatura inferior a 40°C, obtendo ao final (2115g) de planta seca. A exsicata foi depositada no herbário da Universidade Federal de Viçosa sob o número 32147.

2.2. Preparo do extrato vegetal

Após secagem e trituração do material vegetal, uma parte dele (2000g) foi submetida ao processo de percolação seriada. Primeiramente com solvente diclorometano que após a extração exaustiva do material vegetal, o mesmo foi submetido ao processo de evaporação no evaporador rotatório até a completa remoção do solvente, resultando em 67g de extrato seco diclorometânico de *P. vellosiana* (EDPV). No mesmo material vegetal (2000g) foi realizado o processo de percolação seriada com solvente etanólico 95% e evaporação no evaporador rotatório até a completa remoção do solvente, resultando em 100g do extrato seco etanólico de *P. vellosiana* (EEPV).

2.3. Prospecção fitoquímica preliminar

A prospecção fitoquímica das principais classes de metabólicos secundários foi realizada. Para tal, foi obtido o perfil cromatográfico, empregando-se cromatofolhas de sílica gel e eluentes e reveladores, conforme metodologia descrita por Wagner & Blat (1996).

2.4 Análise bromatológica

Os teores de umidade, carboidrato, proteína, lipídeo, cinza das folhas secas de *P. vellosiana* foram determinados por meio de técnicas analíticas descritas pelo INSTITUTO ADOLFO LUTZ (2005).

O teor de matéria seca da amostra foi determinado pela secagem em estufa a 105 °C até atingir peso constante. A concentração de proteína bruta foi determinada pela quantificação de nitrogênio total da amostra de folhas secas, utilizando-se o destilador semimicro Kjeldhal. Para determinar o teor de proteína da amostra, foi multiplicado o teor de nitrogênio encontrado na amostra pelo fator 6,25. Para a quantificação de lipídios foi empregada extração exaustiva com solvente éter etílico, por 5 horas em aparelho extrator tipo Goldfisch. A determinação do teor de cinzas das amostras foi feita por incineração em mufla à temperatura de 550 °C, até a obtenção de cinzas claras. O teor de carboidratos totais foi obtido pela diferença entre o total da amostra (100%) e os teores de proteína, lipídeo, umidade e cinzas.

2.5 Análises de minerais

Para a determinação dos teores de minerais contidos nas folhas secas de *P. vellosiana*, as amostras foram pesadas em uma balança analítica (0,5000 g), sendo, em seguida, digeridas com ácido nitroperclórico. Os teores de Fe e Zn foram determinados por espectrometria de absorção atômica. A leitura foi realizada em espectrofotômetro de absorção atômica modelo Perkin Elmer[®], com lâmpada de cátodo oco, calibrado em condições específicas de comprimento de onda, fenda e mistura dos gases para cada elemento.

Os teores de K foram determinados por fotometria de chama, com limite de detecção da ordem de partes por milhão (ppm). Os outros elementos de interesse como Ca, Pb, Cu, Mg, Mn, Cd, Cr e Ni foram determinados por ICP-Emission

Spectroscopy, e o teor de fósforo (P) por colorimetria. Os resultados obtidos, após três leituras integradas de cada triplicata, foram expressos em g.kg^{-1} de amostra.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos dos extratos secos obtidos por percolação do material vegetal das folhas de *P. vellosiana* com os solventes diclorometânico e etanólico foram 3,33% e 5%, respectivamente.

A identificação das principais classes de metabólitos secundários dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* está descrita na Tabela 1.

Tabela 1 - Identificação das classes de metabólitos secundários dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* através da técnica de cromatografia em camada delgada (CCD)

Metabólitos Secundários	EDPV	EEPV
Flavonóides	+	+
Alcalóides	+	+
Taninos	+	+
Esteróides/triterpenos	+	-
Cumarinas	+	+
Antraquinonas	-	-
Cardiotônicos	-	-

*Presença (+) e Ausência (-)

EDPV:(extrato diclorometânico das folhas de *Psychotria vellosiana*)

EEPV:(extrato etanólico das folhas de *Psychotria vellosiana*)

Para ambos os extratos, foi identificada a presença das classes de flavonoides, alcalóides, taninos e cumarinas, apenas as classes de antraquinonas e cardiotônicos não foram identificadas. As classes de esteróides/triterpenos foram identificadas apenas no EDPV.

Ao determinar o perfil cromatográfico do extrato das folhas de planta da mesma família, *Rudgea viburnoides*, através da cromatografia de camada delgada (CCD), foi identificada a presença de taninos, flavonóides, triterpenos e saponinas (ALVES et al., 2004). Ainda empregando a técnica de CCD, o extrato hidroalcoólico de *Psychotria carthageneis* revelou a presença de esteróides/triterpenos, taninos,

saponinas e flavonóides, enquanto alcalóides e cardiotônicos não foram identificados (BERTUCCI et al., 2008). Para as classes de triterpenos/esteróides e flavonóides podem ser atribuídas atividades biológicas antioxidante e antiinflamatória (BARROS et al., 2008), enquanto os alcalóides podem apresentar atividades biológicas antioxidante e antimutagênica (JARDINI & FILHO, 2007; FRAGOSO, 2008).

Esse estudo é o primeiro relato da presença das classes de metabólitos secundários no extrato diclorometânico e etanólico das folhas da espécie *P. vellosiana*. Por isso, é importante destacar a dificuldade de encontrar na literatura dados científicos que possam corroborar com este estudo. Caso, futuramente, seja atribuída alguma atividade farmacológica para as folhas de *P. vellosiana*, faz-se importante investigar a sua relação com a presença de algumas classes de metabólitos secundários. Posteriores estudos de isolamento, purificação e identificação de metabólitos secundários oriundos das folhas da espécie *P. vellosiana* serão importantes, visando à busca de produtos naturais bioativos.

A Tabela 2 apresenta a composição centesimal das folhas de *P. vellosiana*.

Tabela 2 - Composição centesimal das folhas de *P. vellosiana*

Componente	(%)*
Umidade	11,26
Proteína bruta	16,33
Lipídio	1,92
Carboidratos totais	61,78
Cinzas	8,71

*Resultados expressos com base na matéria seca.

O teor de 16,33% de proteína das folhas de *P. vellosiana* é maior do que o teor encontrado por PORTAL et al. (2002), que relataram um valor médio de 12,70% presente na caracterização físico-química dos frutos da *Psychotria ceysulin*. Já a porcentagem de lipídios encontrada (1,92%) revelou um teor inferior quando comparado ao (teor) dos frutos da *Psychotria ceysulin*, na qual a porcentagem de lipídios foi de 12,70%. O valor de carboidratos totais (61,78%) encontrado nas folhas da *P. vellosiana* pode proporcionar uma fonte considerável de carboidratos totais, incluindo fibras solúveis e insolúveis, que não foram quantificadas neste estudo.

A partir dos resultados, principalmente dos valores de carboidratos e proteínas, desperta a hipótese de que um dos motivos pelos quais os primatas (*Brachyteles*

Hipoxanthus) possam estar se alimentando das folhas da espécie *P. vellosiana* seja seu ponderável valor nutricional. Porém é importante destacar que, mesmo tendo hábito alimentar exclusivamente vegetariano, os primatas (*Brachyteles Hipoxanthus*) não se alimentam exclusivamente das folhas de *P. vellosiana*. Outros estudos realizados no PESB conseguiram levantar a variedade de espécies consumidas, no total 26 espécies distribuídas em 26 gêneros e pertencentes a 18 famílias (GONTIJO, 2007; FÁVARO, 2008).

Na Tabela 3 foram analisados os teores dos minerais das folhas de *P. vellosiana*. Eles foram também confrontados com os teores de minerais das folhas de outras espécies da família rubiácea (*Coffea arabica*, *Captosapelta olaciformis* e *Emeorrhiza umbelata*).

Tabela 3 - Composição mineral das folhas de *P. vellosiana* e de outras espécies da família rubiáceas

Minerais	Quantidade (g.kg ⁻¹)*			
	<i>P.vellosiana</i>	<i>Coffea arabica</i> (1)	<i>Captosapelta olaciformis</i> (2)	<i>Emeorrhiza umbelata</i> (2)
Cádmio	0	-	-	-
Cromo	0	-	-	-
Cobre	0,0043	-	0,005	0,005
Manganês	0,912	-	3,64	0,024
Chumbo	0	-	-	-
Níquel	0	-	-	-
Zinco	0,0124	-	0,046	0,032
Fósforo	0,745	1,2	-	-
Potássio	6,0107	18,1	-	-
Cálcio	7,403	16,3	8,42	15,86
Magnésio	2,465	3,3	-	-
Enxofre	2,036	2,31	-	-
Ferro	0,155	-	0,16	0,25

* Todos os resultados expressos com base em matéria seca das folhas de cada espécie (1) VALARINI et al. (2005); (2) JAEN et al. (2003); - : não foi testado

Entre os resultados dos minerais encontrados para a *P. vellosiana*, o maior valor foi do cálcio (7,40 g.kg⁻¹), seguido pelo valor do potássio (6,01 g.kg⁻¹), enquanto zinco (0,012 g.kg⁻¹) e cobre (0,004 g.kg⁻¹) foram os menores valores. Outros minerais, como cádmio, cromo, chumbo e níquel, não estão presentes nas folhas de *P. vellosiana*. Ao confrontar os resultados encontrados no estudo com *P. vellosiana* com outras espécies da família Rubiaceae, observa-se que, para os minerais como cálcio, cobre e ferro, os valores encontrados se aproximam dos

valores da *Captosapelta olaciformis*, enquanto, para as espécies *Emeorrhiza umbellata* e *Coffea arabica*, os valores se assemelham, respectivamente, para cobre e enxofre.

Segundo os estudos realizados por JAEN et al. (2003), as folhas de outras espécies da família Rubiaceae apresentam valores próximos aos da *P. vellosiana* para minerais como cobre, manganês e zinco. As espécies *Captosapelta olaciformis* e *Emeorrhiza umbellata* possuem ambas 0,005 g.kg⁻¹ de cobre. A *Gouldia terminalis* e *Soprosma arboreum* possuem 0,892 g.kg⁻¹ e 0,737 g.kg⁻¹ de manganês, respectivamente, enquanto, *Allberta minor* e *Triainolepis hildebrandtii*, ambas possuem 0,017 g.kg⁻¹ de zinco.

Não há registro de estudos científicos precisos sobre as exigências de nutrientes para primatas não-humanos, porém há evidências de que o consumo de minerais por primatas não-humanos é superior à quantidade de minerais recomendada para o consumo de homens adultos (MILTON, 1999; 2000; 2003).

É importante destacar o emprego da estratégia de monitoramento da dieta do primata para a seleção de plantas visando a estudos de bioprospecção farmacêutica. Essas informações referentes à composição fitoquímica e nutricional da planta devem fazer parte do banco de dados da extratoteca, de forma a orientar a pesquisa. Vale ressaltar que, pela estratégia etológica, uma planta com baixo teor nutricional fortalece o indicativo de uso dela pelo valor medicinal.

4. CONCLUSÃO

Ocorreu a presença das seguintes classes de metabólitos secundários para os extratos diclorometânico e etanólico de folhas de *P. vellosiana*: flavonóides, alcalóides, taninos e cumarinas. Para o extrato de diclorometano, também foi identificada a presença de esteróides/triterpenos.

A composição centesimal da folha de *P. vellosiana* revelou um considerável valor protéico e de carboidratos e baixo valor de lipídeos. Para os teores de minerais como cálcio, cobre, ferro e enxofre, os valores apresentados são semelhantes aos de outras espécies da família Rubiaceae. Além disso, metais como cádmio, cromo, chumbo e níquel estão ausentes.

O consumo das folhas de *P. vellosiana* pelos primatas não-humanos (*Brachyteles hipoxanthus*) pode ser atribuído, em parte, ao valor nutricional, que está representado pela porcentagem de carboidratos totais, proteínas, lipídios e minerais e também para obtenção de benefícios dos metabólitos secundários presentes nas folhas. É importante destacar que estudo apresenta o primeiro relato na literatura sobre a identificação de metabólitos secundários e composição centesimal para as folhas da espécie *P. vellosiana*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, H.M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, n.3, p.10-15, 2001.
- ALVES, R.M.S.; STEHMANN, J.R.; ISAIAS, R.M.S.; BRANDÃO, M.G.L. Caracterização botânica e química de *Rudgea viburnoides* (Cham.) Benth., (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.1, p.49-56, 2004.
- BARROS, M. P.; SANTIN, S. M. O.; COSTA, W. F.; VIDOTTI, G. J.; SARRAGIOTTO, M. H; SOUZA, M. C.; Bersani-Amado, C. A. Constituintes químicos e avaliação do potencial antiinflamatório e antioxidante de extratos das folhas de *Chomelia obtusa* Cham. & Schltld. (Rubiaceae). **Química Nova**, v.31, n.8, p.1987-1989, 2008.
- BERTUCCI, A.; HARETCHE, F.; OLIVARO, C.; VÁZQUEZ, A. Prospección química del bosque de galería del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.1, p.21-25, 2008.
- BOLZANI, V.S.; YOUNG, M.C.M.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A.J.; ARAÚJO, A.R.; SILVA, D.H.S.; LOPES, M.N. SECONDARY METABOLITES FROM BRAZILIAN RUBIACEAE PLANT SPECIES: CHEMOTAXONOMICAL AND BIOLOGICAL SIGNIFICANCE. **RECENT RESEARCH DEVELOPMENT PHYTOCHEMISTRY**, V.5, P.19-31, 2001.
- CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S.M.; HUFFMAN, M.A.; BARDI M. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self-medication in prosimians? **Primates**, v.44, n.1, p.61-66, 2003.
- FÁVARO, L.B. **Influência da estrutura florestal na área de vida do muriqui-do-norte (*Brachyteles hypoxanthus*) no Parque Estadual da Serra do Brigadeiro-MG**. Lavras, M.G.: UFLA, 2008, 44p. Monografia (Graduação em Engenharia Florestal) - Universidade Federal de Lavras, 2008.
- FRAGOSO, V; NASCIMENTO, N.C; MOURA, D.J; SILVA, A.C.R; RICHTER, M.F; SAFFI, J; FETT-NETO, A.G. Antioxidant and antimutagenic properties of the monoterpene indole alkaloid psychollatine and the crude foliar extract of *Psychotria umbellata* Vell. **Toxicology in Vitro**, v.22, n.3, p.559-566, 2008.

- GAZDA, V.E. Abordagem química e estudo da atividade biológica das raízes de *Chiococca alba* (L.) Hitchc. (Rubiaceae). Rio de Janeiro, R.J.: UFRJ, 2004, 141p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.
- GONTIJO, D.C; FÁVARO, L.B; JÚNIOR, W.M.S; MAIA, R.T; MOREIRA, L.S; VIANA, J.P.L. Abordagem etológica na busca de compostos naturais bioativos no parque estadual da serra do brigadeiro. **In: V Simpósio de Extensão Universitária**, Viçosa, 2007.
- HENRIQUES, A.T.; LOP4ES, S.O.; PARANHOS, J.T.; GREGIANINI, T.S.; VON POSER, G.L.; FETT-NETO, A.G.; SCHRIPSEMA, J. N, β -D-Glucopyranosil vincosamide, a light regulated indole alkaloid from the shoots of *Psychotria leiocarpa*. **Phytochemistry**, v.65, n.4, p.449-454, 2004.
- HUFFMAN, M.A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and exploitation of the medicinal properties of plants. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.62, n.2, p.371-381, 2003.
- HUFFMAN, M.A. Self-medicative behaviour in the African Great: an evolutionary perspective into the origins of human traditional medicine. **BioScience**, v.51, n.8, p.651-661, 2001.
- INSTITUTO ADOLF LUTZ. **Métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 4.ed. Brasília: MS, 2005. 1017p.
- JAEN, S.; WATANABE, T.; DESSEIN, S.; SMETS, E.; ROBBRECHT, E. A comparative study of metal levels in leaves of some Al-accumulating Rubiaceae. **Annals of Botany**, v.91, n.6, p.657-663, 2003.
- JARDINI, F. A.; FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.1, p.137-147, 2007.
- KRIEF, S.; MARTIN, M.T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p.3196-3199, 2004.
- KRIEF, S; HLADIK, C.M; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.1-3, p.1-15, 2005.
- LEWINSOHN, T. M; PRADO, P. I. **Biodiversidade Brasileira – Síntese do estado atual do conhecimento**. 1.ed. São Paulo: Contexto, 2002. 176p.
- LING, S.K.; KOMORITA, A.; TANAKA, T.; FUJIOKA, T.; MIHASHI, K.; KOUNO, I. Iridoids and anthraquinones from the Malaysian medicinal plant,

- Saprosma scortechinii* (Rubiaceae). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.50, n.8, p.1035-1040, 2002.
- LUCIANO, J.H.S.; LIMA, M.A.S.; SOUZA, E.B.; SILVEIRA, E.R. Chemical constituents of *Alibertia myrciifolia* Spruce ex K. Schum. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p.1227-1229, 2004.
- MILTON, K. Back to basics: why foods of wild primates have relevance for modern human health. **Nutrition**, v.16, n.7/8, p.480-483, 2000.
- MILTON, K. Micronutrient intakes of wild primates: are humans different? **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.136, n.1, p.47-59, 2003.
- MILTON, K. Nutritional characteristics of wild primate foods: do the diets of our closest living relatives have lessons for us? **Nutrition**, v.15, n.6, p.488-498, 1999.
- PASSOS, C.S. **Psicolatina: caracterização conformacional e avaliação do efeito sobre os níveis de aminoácidos excitatórios e inibitórios em regiões cerebrais de roedores**. Porto Alegre, RS.: UFRGS, 2008, 127p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.
- PORTAL, R. R.; LIMA, M. A. S.; LUZ, V. L. F.; BATAUS, Y. S. L.; REIS, I. J. Espécies vegetais utilizadas na alimentação de *Podocnemis unifilis*, Troschel 1948 (reptilia, testudinae, pelomedusidae) na região do Pracuúba - Amapá - Brasil. **Ciência Animal Brasileira**, v.3, n.1, p.11-19, 2002.
- VALARINI, V.; BATAGLIA, O. C.; FAZUOLI, L. C. Macronutrientes em folhas e frutos de cultivares de café arábica de porte baixo. **Bragantia**, v.64, n.4, p.661-672, 2005.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: Springer, 1996.

CAPÍTULO 2

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO EFEITO ESTIMULANTE FÍSICO
DE EXTRATOS DE FOLHAS DE *P. VELLOSIANA* BENTH EM DE RATOS
*WISTAR***

1. INTRODUÇÃO

O aumento do consumo de produtos naturais a base de espécies vegetais vem crescendo mundialmente, assim como a auto-medicação com plantas medicinais popularmente utilizadas para profilaxia e tratamento de doenças. Há uma crescente preocupação com a segurança e eficácia do uso desses produtos, pois existe um grande número de espécies popularmente utilizadas que não foram ainda submetidas a comprovação farmacológica e avaliação de toxicidade (JUNIOR et al., 2005; TAGLIATI & FÉRES, 2009).

Estudos utilizando a estratégia etológica demonstram que o acesso às espécies vegetais consumidas por primatas são pouco estudadas quanto ao aspecto fitoquímico e farmacológico, e possibilitam o acesso às espécies endêmicas do bioma. Além disso, despertam o interesse em esclarecer o comportamento de auto-medicação exercido por primatas através das análises de parâmetros nutricionais, fitoquímicos, farmacológicas e de atividades biológicas das espécies consumidas por eles (HUFFMAN, 2001; 2003; CARRAI et al., 2003; KRIEF et al., 2004; 2005).

Algumas espécies de vegetais apresentam como característica a capacidade de aumentar a resistência inespecífica do organismo em situações adversas como estresse, fadiga e doenças, sendo esta peculiaridade definida como efeito adaptógeno ou resistógeno (BREKHMANN & DARDYMOV, 1969). Além disso, a classificação das plantas medicinais em adaptógenas leva em consideração a capacidade de suas propriedades estimulantes ou psicoanalépticas em atuar sobre mediadores do sistema nervoso central (SNC) (CARLINI, 2003). Ao explicar o mecanismo de ação das plantas medicinais adaptógenas, Carlini (2003) descreve a atuação delas sobre o SNC através da síntese de substâncias contendo fenetilamina ou xantina, que possuem o potencial de aumentar os efeitos das catecolaminas sobre o SNC, assim como a ação sobre os receptores de adenosina.

Para avaliar espécies de plantas medicinais com potencial ação adaptógena são usados modelos animais como ratos em estados de hipoglicemia, baixo nível sérico de cortisol, ou submetidos ao teste físico exaustivo. Estas condições têm como objetivo avaliar a capacidade de extratos vegetais em contribuir para a recuperação orgânica dos animais após situações de estresse, assim como a tentativa de explicar o mecanismo de ação delas (BHATTACHARYA & MURUGANANDAM, 2003; KANNUR et al., 2006).

A carência de estudos científicos sobre os possíveis efeitos de produtos de origem vegetal sobre o desempenho físico desperta para a necessidade de novas pesquisas. A seleção da espécie vegetal *P. vellosiana* para estudo de atividade estimulante se justifica pelo fato de ela pertencer a uma família botânica que já apresenta relato de comprovação de ação estimulante para outras espécies de Rubiaceae e também pelo fato de as folhas de *P. vellosiana* serem consumidas por primatas em florestas de Mata Atlântica do estado de Minas Gerais, Brasil. Dessa forma, utiliza-se uma combinação de estratégias quimiotaxonômica e etológica para a busca de plantas com atividade estimulante. O objetivo do presente estudo foi avaliar a toxicidade e o efeito estimulante dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* em ratos Wistar

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Delineamento experimental

Os tratamentos do grupo controle (dimetilsulfóxido), dos grupos dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana*, ambos com doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg, foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado.

2.2. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais

A obtenção do material vegetal e preparo dos extratos diclorometânico (EDPV) e etanólico (EDPV) das folhas de *P. vellosiana* foram descritos detalhadamente na página 35, nos itens 2.1 e 2.2. do Capítulo 1.

2.3. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com 10 semanas de idade, pesando em média 116 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno e mantidos em sala com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade 60% e regime de luminosidade de doze horas claro /escuro. Os acessos a ração e água foram *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o Código de Ética do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após análise e aprovação

do comitê de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade federal de Viçosa, sob parecer protocolado de número 53/2009.

2.4. Protocolo experimental

Inicialmente os animais foram divididos em nove grupos, permanecendo sete animais em cada um (n=7), e foram mantidos em gaiolas coletivas. O grupo G1 recebeu o tratamento apenas com o dimetilsulfóxido (DMSO), sendo caracterizado como grupo controle. O DMSO foi o solvente utilizado para solubilizar o extrato diclorometânico e etanólico. Os grupos G2, G3, G4 e G5 foram tratados com EDPV, nas dosagens de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de peso corporal de animal, respectivamente. Os grupos G6, G7, G8 e G9 foram tratados com EEPV nas dosagens de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de peso corporal (mg/kg), respectivamente (Tabela 4).

A administração das doses de extrato de *P. vellosiana* foi realizada diariamente no mesmo horário, entre 17 e 19 horas, durante um período de 28 dias. O cálculo da quantidade de extrato seco administrada foi realizado com referência na média do peso corpóreo dos animais de cada grupo. A cada setenta e duas horas todos os animais foram pesados para o cálculo da quantidade de extrato seco solubilizada em DMSO. Para ressuspensão de cada dose do extrato foi empregado 1 ml de DMSO por animal, administrado por técnica de gavagem.

Tabela 4 – Grupos de animais tratados com extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana*

Consumo	Grupos	Dose (mg/kg)	n
Controle	(G1)	DMSO	7
Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G2)	100 + DMSO	7
	(G3)	200 + DMSO	7
	(G4)	300 + DMSO	7
	(G5)	400 + DMSO	7
Extrato Etanólico (EEPV)	(G6)	100 + DMSO	7
	(G7)	200 + DMSO	7
	(G8)	300 + DMSO	7
	(G9)	400 + DMSO	7

DMSO: dimetilsulfóxido.

n: número de animais por grupo.mg/kg:

miligramas/kilogramas de peso corporal.

2.5. Avaliação da toxicidade de extratos de folhas de *P. vellosiana*

Para avaliar a toxicidade dos EDPV e EEPV foram analisados o peso corporal, peso do fígado e peso do coração dos animais. Foram calculados os índices hepatossomático (IHS) e cardiossomático (ICS) e realizadas análises dos parâmetros bioquímicos séricos dos animais. Os animais foram submetidos a eutanásia em jejum de doze horas após o período de 28 dias de consumo dos extratos.

2.5.1. Peso corporal e dos órgãos

O peso corporal individual foi registrado durante o tratamento dos animais com os extratos diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de *P. vellosiana*. Os registros dos pesos do fígado e do coração foram realizados apenas após eutanásia dos animais de cada grupo experimental. Todos os resultados sobre o peso corporal, peso do fígado e peso do coração foram expressos em gramas.

2.5.2. Índice hepatossomático e cardiossomático

Após a eutanásia dos animais foram retirados e pesados individualmente em balança analítica o fígado e o coração . Os valores expressos em gramas são referentes à média dos grupos.

O fígado e o coração de cada animal foram pesados em balança de precisão para o cálculo do peso relativo. O peso do fígado foi denominado de índice hepatossomático (IHS) e o peso do coração foi denominado de índice cardiossomático (ICS). Para o cálculo percentual dos pesos relativos, dividiu-se o valor encontrado para o peso do coração/ou fígado pelo peso corporal do animal, seguindo a fórmula abaixo:

$$\text{ICS ou IHS: PO/PCT x 100}$$

Onde:

ICS: Índice Cardiossomático;

IHS: Índice Hepatossomático;

PO: Peso do órgão (coração ou fígado);

PCT; Peso corporal total.

2.5.3. Parâmetros bioquímicos

Antes da eutanásia os animais foram submetidos a um jejum de doze horas. O sangue dos animais utilizados para análise dos parâmetros bioquímicos foi coletado por punção da artéria femoral. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 3.500 rpm durante um período de 10 minutos. Posteriormente, o soro foi coletado e armazenado em freezer a -80°C.

Para avaliar a toxicidade, realizou-se a análise dos níveis séricos de creatinina, das transaminases alanina aminotransferase (ALT) e aspartato amino transferase (AST). Para avaliar possíveis alterações metabólicas, realizou-se a análise dos níveis séricos de glicose, triglicerídeos e colesterol total.

Para a dosagem sorológica da glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, foram adicionados 10 µL de amostra sorológica em 1mL de reagente específico para cada parâmetro analisado. Em seguida, as amostras foram submetidas ao banho-maria a 37°C durante 10 minutos, para posterior leitura com os resultados expressos em mg/dL. Para a dosagem sorológica de ALT e AST foram adicionados 100µL de amostra sorológica em 1mL de reagente específico para cada parâmetro analisado e os resultados foram expressos em U/L. Todos os ensaios foram realizados em aparelho automático (BioPlus-200) com kits comerciais Katal®.

2.6. Avaliação do efeito estimulante de extratos de folhas de *P. vellosiana*

Para avaliar o efeito estimulante, ou adaptógeno, de EDPV e EEPV foram realizados teste de exercício máximo até a exaustão de corrida em esteira e análises dos níveis de lactato sanguíneo dos animais.

2.6.1. Protocolo de exercício

Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício máximo até a exaustão em esteira, como descrito por KOCH & BRITTON (2001), com algumas alterações. A principal modificação do teste foi a utilização do critério de fadiga e não de exaustão para interrupção do teste. A fadiga caracteriza-se pela interrupção voluntária do exercício (LAMBERT et al., 2005), seguindo estes critérios:

permanência do animal por mais de dez segundos na grade; o animal apoiar as patas traseiras sobre a grade e movimentar apenas as patas dianteiras arrastando sobre a esteira.

O protocolo modificado consistiu de quatro dias seguidos de adaptação à esteira. Durante os quatro dias de adaptação de corrida na esteira, foram mantidas constantes as variáveis velocidade e tempo, e os animais correram à velocidade de dez metros por minuto (m/min), durante dez minutos. A intensidade foi aumentada através da elevação da inclinação da esteira, no primeiro dia a esteira foi mantida em zero grau, no segundo, passou para dez graus, e no terceiro e quarto dias, ficou em quinze graus.

Quarenta e oito horas após o último dia de adaptação, os animais foram submetidos ao teste de exercício máximo que foi realizado três vezes, em dias consecutivos, com intervalo de 24 horas entre os testes.

Durante o teste, a inclinação da esteira ficou mantida constante em 15 graus, com velocidade inicial de 10 m/min, sendo que, a cada dois minutos a velocidade aumentava em um m/min. Foram monitorados o tempo até a fadiga final e a velocidade final atingida pelos animais durante o exercício. As médias dos tempos e velocidades dos três testes foram utilizadas para definir o desempenho dos animais.

2.6.1.1. Variável tempo

Os grupos de animais foram avaliados quanto ao tempo total de corrida (TTC) em esteira até a fadiga, sendo que estes resultados foram expressos em minutos (min).

2.6.1.2. Variável velocidade

Os grupos de animais foram avaliados quanto à velocidade final atingida (VFA) em corrida de esteira, sendo que estes resultados foram expressos em metros por minutos (m/min).

2.6.1.3. Lactato sanguíneo

Os níveis de lactato sanguíneo dos animais foram mensurados apenas no último dia de teste, em dois momentos distintos, antes e após o teste de exercício máximo até a exaustão. A diferença entre os valores de lactato sanguíneo nos dois momentos em que foram mensurados (antes e após o teste de exercício máximo até a exaustão) atribui-se a condição de variação do lactato sanguíneo.

Para a análise dos níveis de lactato foi coletada uma gota de sangue da cauda do animal. A análise foi realizada usando-se um lactímetro (Accutrend PLUS - Roche®).

2.7. Análise estatística

Os dados obtidos foram interpretados por meio do PROC-GLM e as médias dos grupos tratados com os extratos foram comparadas com as médias do grupo tratado com DMSO pelo teste de Dunnett, adotando-se 5% de probabilidade.

As análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute), versão 8.2 (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Toxicidade e alteração metabólica de extratos de folhas de *P. vellosiana*

Na Tabela 5 estão apresentados os valores médios do peso corporal final (PCF), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) dos animais avaliados. Os grupos G1, G2, G3, G5 e G7 tiveram um número reduzido de animais por grupo ao término do experimento, devido à morte de alguns animais.

Tabela 5 - Valores médios do peso corporal final (PCF), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de *P. vellosiana* após teste de exercício máximo até a exaustão em esteira

Tratamentos	Grupo	Doses (mg/kg)	PCF (g)	PF (g)	PC(g)	n
Controle	(G1)	0	311,17±27,19	8,42±1,34	1,07±0,14	6
Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G2)	100	313,67±36,27	7,93±1,23	1,05±0,15	6
	(G3)	200	299,25±49,23	8,00±1,25	1,13±0,17	4
	(G4)	300	319,86±26,76	8,29±0,66	1,24±0,14	7
	(G5)	400	314,33±25,96	7,88±1,39	1,13±0,12	6
Extrato Etanólico (EEPV)	(G6)	100	332,71±22,91	8,51±0,71	1,31±0,09*	7
	(G7)	200	338,83±31,11	8,72±1,15	1,15±0,10	6
	(G8)	300	323,00±18,93	8,04±0,62	1,09±0,11	7
	(G9)	400	325,86±46,14	8,50±0,81	1,09±0,23	7

* Significativo pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade. mg/kg: miligramas por kilogramas de peso corporal. Resultados expressos em gramas (g). n: número de animais por grupo.

Não foi observada diferença significativa ($P>0,05$) para os valores de PCF e PF dos grupos de animais que consumiram as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg dos EDPV e EEPV, quando comparados ao controle (Tabela 5). Todos os grupos de animais tiveram peso corporal final (PCF) homogêneo devido ao crescimento, mostrando que o tratamento com o extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico

(EEPV) das folhas de *P. vellosiana*, durante 28 dias não afetou o ganho de PCF e PF dos animais.

Sobre o PC, apenas o grupo (G6) que consumiu a dose de 100 mg/kg do EEPV apresentou diferença significativa ($P < 0,05$) em relação ao grupo controle (Tabela 5). Porém, os resultados encontrados para o índice cardiossomático (ICS) (Tabela 6) não confirmaram a diferença significativa ($P > 0,05$) entre o PC do grupo (G6) tratado com a dose de 100 mg/kg do EEPV e o grupo controle. Os índices hepatossomático (IHS) e cardiossomático (ICS) demonstram o peso relativo do fígado e coração respectivamente, ou seja, a relação existente entre o peso dos órgãos e o peso corporal total dos animais.

Na Tabela 6 estão apresentados os valores médios do índice hepatossomático (IHS) índice cardiossomático (ICS) dos animais avaliados. Os grupos G1, G2, G3, G5 e G7 tiveram um número reduzido de animais por grupo ao término do experimento, devido à morte de alguns animais.

Tabela 6 - Valores médios do índice hepatossomático (IHS) e o índice cardiossomático (ICS) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de *P. vellosiana* após teste de exercício máximo até a exaustão em esteira

Tratamentos	Grupos	Doses				
		(mg/kg)	IHS (%)	ICS(%)	n	
Controle	(G1)	0	2,69±0,25	0,34±0,04	6	
	(G2)	100	2,52±0,17	0,33±0,05	6	
	Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G3)	200	2,67±0,08	0,44±0,14	4
		(G4)	300	2,59±0,12	0,38±0,05	7
		(G5)	400	2,49±0,25	0,36±0,06	6
Extrato Etanólico (EEPV)	(G6)	100	2,55±0,08	0,39±0,03	7	
	(G7)	200	2,56±0,12	0,34±0,04	6	
	(G8)	300	2,49±0,22	0,33±0,04	7	
	(G9)	400	2,63±0,27	0,34±0,12	7	

* Significativo pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade. Resultados expressos em porcentagem (%). mg/kg: miligramas por kilogramas de peso corporal. n: número de animais por grupo.

Sobre o índice hepatossomático (IHS) e o índice cardiossomático (ICS) não foram observadas diferenças significativas ($P < 0,05$) para nenhum dos grupos de animais tratados com extratos diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) das folhas de *P. vellosiana*, durante 28 dias, quando comparados com o controle (Tabela 6).

Os resultados revelaram que não ocorreu qualquer indício de toxicidade para os grupos de animais tratados com as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de EDPV e EEPV das folhas de *P. vellosiana*. Os resultados encontrados neste estudo para o efeito de toxicidade dos extratos das folhas de *P. vellosiana* em ratos reforçam a hipótese de que as folhas consumidas pelos primatas (muriquis) não têm efeito tóxico.

Os resultados encontrados para PCF e IHS estão de acordo com estudo que avaliou os efeitos do extrato das folhas de *Stefhania hernandifolia* em ratos machos, durante 28 dias de tratamento (GOSH et al., 2002), e com os efeitos do extrato aquoso das folhas de *Aegle marmelos* em ratos machos, durante 28 dias (KUMAR DAS et al., 2006). Estes estudos concluíram que ambos os extratos não causaram efeitos de hepatotoxicidade.

Os resultados deste estudo demonstram que o tratamento com EDPV e EEPV, durante 28 dias, com as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg, não provocaram alteração no PCF, PF, PC, IHS e ICS dos animais, indicando que as doses testadas não possuem efeito tóxico para estas condições experimentais propostas e ainda corroboram com resultados encontrados por outros estudos (GOSH et al., 2002; KUMAR DAS et al., 2006).

3.1.2. Parâmetros bioquímicos

A Tabela 7 apresenta os valores médios dos teores sanguíneos de glicose (GLC), triglicerídeos (TGC), colesterol total (CT), creatinina (CREAT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (ASP) dos animais avaliados.

Tabela 7 - Valores médios dos teores sanguíneos de glicose (GLC), triglicerídeos (TGC), colesterol total (CT), creatinina (CREAT), alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) de ratos tratados com diferentes doses de extrato diclorometânico (EDPV) e etanólico (EEPV) de *P. vellosiana* após teste de exercício máximo até exaustão

Tratamentos	Grupos	Doses mg/kg	GLC (mg/dL)	TGC (mg/dL)	CT (mg/dL)	CREAT (mg/dL)	ALT (U/L)	AST (U/L)	n
Controle	G1	0	128,75±15,20	42,30±5,53	60,50±8,06	0,45±0,10	59,00±9,90	104,00±18,52	6
	G2	100	118,60±20,91	95,38±59,23	120,8±85,29	0,63±0,15	64,60±21,80	133,80±30,45	6
EDPV	G3	200	137,63±47,96	57,33±8,76	90,33±13,32	0,45±0,07	37,67±15,82	112,67±53,00	4
	G4	300	108,89±24,71	83,17±25,10	87,57±14,35	0,53±0,11	68,17±13,88	99,20±21,57	7
	G5	400	112,97±15,64	69,60±16,78	74,83±9,00	0,35±0,08	60,50±12,52	138,40±21,37	6
EEPV	G6	100	121,20±11,63	63,64±24,85	70,57±26,51	0,53±0,30	57,43±8,00	88,29±41,89	7
	G7	200	165,42±22,23*	61,28±15,22	71,17±10,00	0,63±0,10	82,00±22,19	105,0±25,21	6
	G8	300	130,69±17,33	74,36±7,10*	77,29±7,41	0,60±0,17	72,71±18,04	142,0±16,58	7
	G9	400	147,24±20,75	79,49±24,01*	75,86±9,15	0,56±0,11	54,71±6,73	124,0±24,70	7

* Diferente de G1 pelo teste Dunnett. Dados expressos em miligramas por decilitros (mg/dL), unidades por litros (U/L) e miligramas por kilogramas de peso corporal (mg/kg).n=números de animais.

O tratamento com EDPV e EEPV nos ratos induziu poucas modificações no perfil bioquímico (Tabela 7), sendo que a maioria dos parâmetros avaliados não foi significativa ($P>0,05$), quando comparada com o controle.

Sobre os parâmetros relacionados às alterações metabólicas, apenas dois parâmetros mostraram diferença significativa ($P<0,05$) em relação ao grupo controle. Estes parâmetros foram: glicose do grupo de 200 mg/kg ($165,41\pm 22,2$ mg/dL) e triglicerídeos dos grupos de 300 e 400 mg/kg ($74,35\pm 7,09$ e $79,48\pm 24,01$ mg/dL, respectivamente) do EEPV. O aumento significativo da glicose e dos triglicerídeos pode ser uma resposta às alterações no metabolismo destes parâmetros para os grupos de animais tratados com as doses de 200, 300 e 400 mg/kg do EEPV. Os valores encontrados para GLC, TGC e CT são próximos dos valores relatados por outros estudos (MARTINS et al., 2006; RODRIGUES et al., 2006; CUNHA et al., 2009), que avaliaram alterações metabólicas de extratos de plantas de outras espécies em modelo animal.

Os parâmetros relacionados à toxicidade (CREAT, ALT e AST) não foram significativos ($P>0,05$), quando comparados com o controle (Tabela 7).

A importância em se averiguar os valores plasmáticos de creatinina é que o aumento deles fornece um indicativo de sobrecarga renal, insuficiência renal e até de elevação do catabolismo de proteínas (ADEBAYO et al., 2003). A alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) são bons indicadores de lesões das células hepáticas, de grande relevância em estudos de toxicidade de extrato de plantas em modelos animais e os valores encontrados para CREAT, ALT e AST são semelhantes aos valores encontrados por outros estudos (SILVA et al., 2005; MARIZ et al., 2006; CUNHA et al., 2009). É importante ressaltar a maior sensibilidade da ALT a hepatotoxicidade, já que a sua presença é essencialmente nas células hepáticas, enquanto a AST pode ser encontrada com valor alto em órgãos como rins, pulmões e coração (AL-HABORI et AL., 2002).

Para os parâmetros bioquímicos avaliados neste estudo, é importante destacar que não foram encontrados, em literatura específica e confiável, estudos com utilização dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* em modelo animal, fato que dificulta a correlação dos resultados com outros trabalhos e coloca este estudo como pioneiro.

3.2. Efeito estimulante de extratos de folhas de *P. vellosiana*

3.2.1. Desempenho físico dos animais

A Tabela 8 descreve os valores médios das variáveis relacionadas ao desempenho físico dos animais, tempo total de corrida até a fadiga (TTC) e velocidade final atingida (VFA).

Tabela 8 - Valores médios das variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de *P. vellosiana* durante o teste de exercício máximo até a exaustão em esteira

Tratamentos	Grupos	Doses (mg/kg)	TTC (min)	VFA (m/min)	n
Controle	(G1)	0	10,04±0,45	14,76±0,22	4
	(G2)	100	10,27±0,81	14,56±0,59	4
Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G3)	200	12,13±2,47	15,67±1,41	3
	(G4)	300	11,62±1,70	15,27±0,90	4
	(G5)	400	11,39±4,08	15,79±1,96	4
	(G6)	100	7,91±3,35	13,54±1,74	4
Extrato Etanólico (EEPV)	(G7)	200	8,62±1,00	13,16±1,04	3
	(G8)	300	11,73±2,62	15,25±1,06	3
	(G9)	400	13,19±8,10	16,00±4,24	3

* Significativo pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade. TTC: tempo total de corrida. VFA: velocidade final atingida. min: minutos. m/min: metros/minutos. mg/kg: miligramas/kilogramas de peso corporal

Os valores médios de tempo total de corrida até a fadiga (TTC) e velocidade final atingida (VFA) dos grupos EDPV e EEPV não apresentaram diferença significativa ($P>0,05$), quando comparados com o controle (Tabela 8).

Estes resultados preliminares revelaram indícios de que, estatisticamente, o consumo de EDPV e EEPV, durante 28 dias, nas doses testadas não promoveram efeito de melhora no desempenho dos ratos sedentários no teste de exercício máximo até exaustão em esteira. Portanto, para as condições de estresse (exercício exaustivo em esteira) em que os animais foram submetidos, o tratamento repetitivo com as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de EDPV e EEPV não forneceram resultados preliminares que apontem para classificar o efeito dos EDPV e EEPV como estimulante.

Em outro modelo de exercício como o teste exaustivo de natação, os efeitos do consumo de extratos de diferentes espécies vegetais, no tempo de natação forçada de camundongos, foram significativos ($P<0,05$), porém divergentes. Os extratos das

espécies *Cordyceps militaris* (CM), *Paecilomyces japonica* (PJ) e *Grifola frandosa* (GF) promoveram o aumento do tempo de desempenho dos camundongos (142.6±9.9 min, 140.9±27.0 min, 150.4±18.7 min, respectivamente), enquanto os extratos de *Phellinus linteus* (PL), *Ganoderma lucidum* (GL) e *Panax Ginseng* (PG) reduziram o tempo de desempenho dos camundongos (JUNG et al., 2004).

É importante destacar que o objetivo deste estudo se limitou a testar o efeito estimulante dos EDPV e EEPV nas doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de forma repetitiva, por um período de 28 dias. Não foi objetivo deste estudo avaliar o efeito estimulante para dose única ou repetitiva com valores acima de 400 mg/kg.

3.2.2. Variação dos valores de lactato sanguíneo

Os valores da variação do lactato sanguíneo (Δ LS) representados na Tabela 9 foram calculados pela diferença do valor de lactato sanguíneo em dois momentos distintos, antes e após o teste de corrida na esteira.

Tabela 9 - Valores médios da variação do lactato sanguíneo (Δ LS), de ratos tratados durante 28 dias com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de *P. vellosiana* no teste de exercício máximo até exaustão em esteira

Tratamentos	Grupos	Doses (mg/kg)	Δ LS (mmol/L)	n	
Controle	(G1)	0	1,48±0,98	4	
	(G2)	100	0,48±0,38	4	
	Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G3)	200	1,24±0,11	3
		(G4)	300	0,8±0,7	4
		(G5)	400	0,3±0,43	4
		(G6)	100	0,67±0,66	4
Extrato Etanólico (EEPV)	(G7)	200	1,2±0,34	3	
	(G8)	300	0,5±0,3	3	
	(G9)	400	1,4±1,11	3	

* Diferente de G1 pelo teste de Dunnett a 5% de probabilidade.

Δ LS: variação do lactato sanguíneo. Resultados expressos em mmol/L: milimol/L. mg/kg: miligramas/kg de peso corporal

Observa-se que os valores encontrados para a variação de lactato (Δ LS), dos grupos dos animais tratados com as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg do EDPV e EEPV, não apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$), em relação ao grupo controle (Tabela 9). Estes resultados sugerem que as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg do EEPV e EEPV não foram capazes de reduzir

significativamente ($p > 0,05$) o acúmulo de lactato no sangue dos animais após exercício máximo até a exaustão em esteira.

Não foi objetivo neste estudo verificar o efeito das doses com valores acima de 400 mg/kg de EDPV e EEPV na variação de lactato sanguíneo, porém os efeitos dos extratos de diferentes espécies vegetais com dose de 500 mg/kg na capacidade de natação forçada de camundongos, demonstram que o grupo de camundongos que consumiram extrato de *Grifola fandosa* tiveram seus valores de lactato sanguíneo significativamente reduzidos, após teste de natação forçada, comparado ao grupo controle (JUNG et al., 2004).

É importante lembrar que, no organismo em exercício exaustivo, a taxa de demanda de substrato é maior do que a taxa de fornecimento, e gera-se um déficit energético que necessita ser rapidamente suprido através de via energética anaeróbica. Esta via (anaeróbica) independe da presença de oxigênio para o fornecimento de energia celular e tem como metabólito final o lactato. Sabe-se que, durante exercício exaustivo ocorre maior produção de lactato em detrimento da capacidade do organismo em metabolizá-lo, gerando um acúmulo orgânico do lactato. O acúmulo excessivo de lactato é apontado como uma das causas da fadiga, já que esta é multifatorial, e, mesmo que a redução do pH da célula não seja a principal causa da fadiga, o acúmulo do lactato tem sido relacionado com a redução da força muscular. (ALLEN et al., 2008).

4. CONCLUSÃO

A análise conjunta dos resultados apresentados nesse capítulo demonstra ausência de toxicidade hepática e renal dos animais tratados com extrato diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* para as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg e uma indicação preliminar de que eles não possuem efeito estimulante nas condições experimentais avaliadas, já que, não foi observada diferença significativa no tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) e variação do lactato sanguíneo (Δ LS) dos animais no teste de exercício máximo até a exaustão.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADEBAYO, J.O.; YAKUBU, M.T.; EGWIM, E.C.; OWOYELE, V.B.; ENAIBE, B.U. Effect of ethanolic extract of *khaya senegalensis* on some parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p. 69-72, 2003.
- AL-HABORI, M.; AL-AGHBARI, A.; AL-MAMARY, M.; BAKER, M. Toxicological evaluation of *Catha edulis* leaves a long term feeding experiment in animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v.83, p. 209-217, 2002.
- ALLEN, D.G; LAMB, D.G; WESTERBLAD, H. Skeletal muscle fatigue: cellular mechanisms. **Physiological Reviews**, v.88, n.1, p.287-332, 2008.
- BHATTACHARYA, S.K; MURUGANANDAM, A.V. Adaptogenic activity of *Withania somnifera*: an experimental study using a rat model of chronic stress. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.547-555, 2003.
- BREKHMANN, I.I; DARDYMOV, I.V. New substances of plants origin which increase nonspecific resistance. **Annual Reviews Pharmacology**, v.9, p.419-430, 1969.
- CARLINI, E.A. Plants and the central nervous system. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.75, n.3, p.501-512, 2003.
- CARRAI, V.; BORGOGNINI-TARLI, S.M.; HUFFMAN, M.A.; BARDI, M. Increase in tannin consumption by sifaka (*Propithecus verreauxi verreauxi*) females during the birth season: a case for self-medication in prosimians? **Primates**, v.44, n.1, p.61-66, 2003.
- CUNHA, L.C.; AZEREDO, F.S.; MENDONÇA, A.C.V.; VIEIRA, M.S.; PUCCI, L.L.; VALADARES, M.C.; FREITAS H.O.G.; SENA, A.A.S.; LINO JUNIOR, R.S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2a, p.403-411, 2009.
- GOSH, D.; JANA, D.; DEBNATH, J.M. Effects of leaf extract of *Stephania hernandifolia* on testicular gametogenesis and androgenesis in albino rats : a dose-dependent response study. **Contraception**, v.65, p. 379-384, 2002.
- HUFFMAN, M.A. Animal self-medication and ethno-medicine: exploration and

- exploitation of the medicinal properties of plants. **Proceedings of the Nutritional Society**, v.62, n.2, p.371-381, 2003.
- HUFFMAN, M.A. Self-medicative behaviour in the African Great: an evolutionary perspective into the origins of human traditional medicine. **BioScience**, v.51, n.8, p.651-661, 2001.
- JUNG, K; KIM, I.H; HAN, D. Effect of medicinal plant extracts on forced swimming capacity in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.73, n.1, p.75-81, 2004.
- JUNIOR, V. F. V.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p.519-528, 2005.
- KANNUR, D.M.; HUKKERI, V.I.; AKKI, K.S. Adaptogenic activity of *Caesalpinia bonduc* seed extracts in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.108, n.3, p.327-331, 2006.
- KOCH, L.G.; BRITTON, S.L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiological Genomics**, v.5, n.1, p.45-52, 2001.
- KRIEF, S.; MARTIN, M.T.; GRELLIER, P.; KASENENE, J.; SÉVENET, T. Novel antimalarial compounds isolated in a survey of self-medicative behavior of wild chimpanzees in Uganda. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.48, n.8, p.3196-3199, 2004.
- KRIEF, S; HLADIK, C.M; HAXAIRE, C. Ethnomedicinal and bioactive properties of plants ingested by wild chimpanzees in Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v.101, n.1-3, p.1-15, 2005.
- KUMAR DAS, MAITI, R.; JANA, D.; GOSH, D. Effect of aqueous extract of leaf of *Aegle marmelos* on testicular activities in rats. **Iranian Journal of Pharmacology & Therapeutics**, v.5, n.1, p. 21-25, 2006.
- LAMBERT, E.V.; CLAIR GIBSON, A.S.; NOAKES, T.D. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. **British Journal of Sports Medicine**, v.39, n.1, p.52-62, 2005.
- MARIZ, S.R.; CERQUEIRA, G.S.; ARAÚJO, W.C.; DUARTE, J.C.; MELO, A.F.M.; SANTOS, H.B.; OLIVEIRAS, K.; DINIZ, M.F.F.M.; MEDEIROS, I.A. Estudo toxicológico agudo do extrato etanólico de partes aéreas de *Jatropha gossypifolia* L. em ratos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.3, p.372-378, 2006.
- MARTINS, N.H.; MONTEIRO, D.A.; PINTO, F.G. Efeito da administração de *Garcinia Camboja* sobre os parâmetros bioquímicos do sangue e do ganho de peso de ratos saudáveis. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, n.4, p.137-143, 2006.
- RODRIGUES, E.R.; MARTINS, C H.G.; MORETI, D.L.C.; LOPES, R.A.; VASCONCELOS, M.A.L.; TAVEIRA, P.M.A.; LOPES, M.E. Estudo de parâmetros bioquímicos em ratos sob ação de planta medicinal XVI Punica

granatum L. **Revista Científica da Universidade de Franca**, v.6, n.1, p.79-84, 2006.

SILVA, E.J.R.; AGUIAR, F.J.S.; GONÇALVES, E.S.; SOUSA, I.M.V.; DIMECH, G.S.; FRAGA, M.C.C.A.; COELHO, M.C.O.C.; WANDERLEY, A.G. Avaliação do tratamento subcrônico com o extrato hidroalcoólico de *Calendula officinalis* L. sobre os parâmetros bioquímicos e hematológicos em ratas Wistar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.2, p.88-93, 2005.

STATISTICAL ANALYSIS SYSTEM - SAS. **SAS System for Windows**. release 8.2. Cary: 2001 (CD-ROM).

TAGLIATI, C.A.; FÉRES, C.A.O. Pesquisas toxicológicas e farmacológicas. In: LEITE, J.P.V. **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**. 1.ed. São Paulo: Atheneu, p.119-140, 2009.

CAPÍTULO 3

**POTENCIAL ANTIOXIDANTE *IN VITRO* DOS EXTRATOS DE
PSYCHOTRIA VELLOSIANA BENTH E SEUS EFEITOS SOBRE
ATIVIDADE DE CATALASE (EC 1.11.1.6)**

1. INTRODUÇÃO

Durante o processo de respiração celular, uma pequena parcela de moléculas de oxigênio que não sofre redução a água é convertida em produtos parcialmente reduzidos como o radical ânion superóxido, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila. As espécies reativas de oxigênio são denominadas EROs e possuem potencial oxidante que pode causar nas células danos em membranas celulares via reações com carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos e óxido nítrico, alterando o equilíbrio celular e consequentemente as funções dos tecidos (HALLIWELL & GUTTERIDGE, 1989; RIBEIRO et al., 2008).

O potencial biológico das espécies vegetais tem contribuído para o desenvolvimento de estudos que avaliam a atividade antimutagênica, antitumoral, analgésica, antiinflamatória e antioxidante. A capacidade antioxidante das espécies vegetais tem sido atribuída principalmente à ação dos compostos fenólicos, que podem estar presentes nas classes de metabólitos secundários denominados flavonóides. (FARIAS, 2006).

Diferentes estratégias são utilizadas para o desenvolvimento de estudos de bioprospecção com espécies vegetais como randômica, quimiotaxonômica, etnofarmacológica e etológica. A estratégia etológica monitora o comportamento animal e sua relação com espécies vegetais, sendo esta uma eficiente ferramenta para estudos com diferentes objetivos, dentre os quais está o acesso às espécies vegetais com potencial farmacológico desconhecido. (ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006). O consumo das folhas da espécie vegetal *P. vellosiana* no PESB pelos primatas *B. hipoxanthus* (muriquis) pode estar relacionado ao valor nutricional, medicamentoso, ou de ambos, agregados a esta espécie vegetal. O valor medicamentoso pode ser representado pela presença de uma variedade de metabólitos secundários, como os flavonóides, alcalóides, cumarinas, taninos,

esteróides/ triterpenos e antraquinonas. Já o valor nutricional é atribuído à proporção de proteínas, carboidratos e lipídios que estão presente nas folhas de *P. vellosiana*, além da presença de minerais importantes como o cálcio, potássio, magnésio, ferro e outros que são fundamentais para alguns processos fisiológicos.

Define-se como estresse oxidativo a alteração no estado de equilíbrio entre produção de EROs e sua remoção pelos sistemas antioxidantes celulares (FINKEL, 2003), e estudos têm proposto o exercício físico como modelo para induzir o estresse em modelo animal, uma vez que, durante o exercício, o aumento da demanda energética e da respiração celular resultam em varias reações químicas levam a formação das EROs (NETTO Jr. et al., 2007).

Há diferentes métodos de avaliação da atividade antioxidante. *In vitro*, por exemplo, é utilizado o método de sequestro do radical livre por antioxidantes, denominado DPPH (1,1-difenil- 2-picrilhidrazina). O método de avaliação *in vivo* pode ocorrer através das análises enzimáticas denominadas catalase, superóxido dismutase em tecidos como rins, fígado, cérebro, coração e soro sanguíneo (PRADO & ARAGÃO, 2009; LIMA et al., 2007).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico das folhas de *P. vellosiana* (EEPV) pelo teste de atividade de sequestro de radicais livres (DPPH) e o efeito *in vivo* dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *Psychotria vellosiana* (EDPV e EEPV) sobre a atividade enzimática da catalase hepática de ratos submetidos a teste de exaustão de corrida em esteira.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Atividade antioxidante *in vitro*

2.1.1. Obtenção do material vegetal e preparo dos extratos vegetais

A obtenção do material vegetal e preparo dos extratos diclorometânico (EDPV) e etanólico (EDPV) das folhas de *P. vellosiana* foram descritos detalhadamente na página (a ver) dos itens 2.1 e 2.2. do Capítulo 1.

2.1.2. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

A ação antioxidante foi analisada pela capacidade dos antioxidantes presentes na amostra de eliminar o radical livre DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), conforme as metodologias descritas por VICENTINO e MENEZES (2007) e SOUSA et al. (2007), com algumas modificações. A solução de DPPH possui uma coloração roxa intensa e a ação antioxidante de um extrato pode ser visualizada pelo progressivo descoloramento da solução, ao final do qual ela torna-se amarelada. Como este método baseia-se na redução do DPPH, a mudança de coloração é resultante do decréscimo de absorvância, e a presença de compostos capazes de doar hidrogênios ou sequestrar o radical permite calcular a concentração eficiente (IC_{50}). A concentração eficiente (IC_{50}) representa a quantidade de antioxidante necessária para reduzir 50% do DPPH após o equilíbrio da reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 517n.

As amostras foram pesadas em balança analítica e preparadas adicionando-se 1mL de solução 0,06 mM de DPPH em metanol a 2,5 mL de soluções dos extratos diluídos em metanol, na concentração de 80 μ g/mL. Para este teste foram preparadas

diluições do extrato com 80, 60, 40, 20 e 5 µg/mL. A determinação da IC₅₀ foi obtida por regressão logarítmica dos pontos plotados graficamente, onde a ordenada representa a atividade antioxidante (%) das amostras, resultante de três determinações e a abscissa, a concentração do extrato (µg/mL) (Figura 10). Como referência, adotou-se o antioxidante BHT, composto orgânico lipossolúvel e usado como: aditivo alimentar com o código E321, conservante também para cosméticos, remédios, combustível, borracha e taxidermia, cujo valor de IC₅₀ foi obtido nas mesmas condições citadas acima.

Nos brancos, em vez do DPPH, adicionou-se 1 mL de metanol aos extratos diluídos nas mesmas concentrações das amostras, e o controle foi preparado com 1 mL de DPPH e 2,5 mL de metanol. Trinta minutos após a adição de DPPH às amostras, foi feita a leitura em espectrofotômetro de Ultravioleta UV-vis Shimadzu UV 1601, em 515nm. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação:

$$\%AA = \frac{ABS_{controle} - (ABS_{amostra} - ABS_{branco})}{ABS_{controle}} \times 100$$

onde:

ABS controle é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH, e ABS amostra é a absorvância da mistura reacional (DPPH+amostra).

2.2. Ensaio biológico

2.2.1. Delineamento experimental

Os tratamentos do grupo controle (Dimetilsulfóxido) e dos grupos dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana*, ambos com doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg, foram dispostos em Delineamento Inteiramente Casualizado.

2.2.2. Local e duração

O experimento animal foi conduzido no Laboratório Experimental do Departamento de Educação Física do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Viçosa, nos meses de dezembro de 2009 e janeiro e fevereiro de 2010.

2.2.3. Animais

Foram utilizados ratos machos adultos (*Rattus norvegicus*), linhagem Wistar, com 10 semanas de idade, pesando em média 116 gramas, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, da Universidade Federal de Viçosa.

Os animais foram alojados em gaiolas de polietileno, mantidos em sala com temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$, umidade 60% e regime de luminosidade de doze horas claro / escuro. O acesso a ração e água foram *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram realizados de acordo com o Código de Ética do Médico Veterinário, com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), após análise e aprovação do comitê de ética do Departamento de Medicina Veterinária da Universidade federal de Viçosa, sob parecer protocolado de número 53/2009.

2.2.4. Protocolo experimental

Os animais foram divididos em nove grupos, permanecendo sete animais em cada um (n=7). Eles foram mantidos em gaiolas coletivas. O grupo um (G1) recebeu o tratamento apenas com dimetilsulfóxido (DMSO), sendo caracterizado como grupo controle. O DMSO foi o solvente utilizado para solubilizar o extrato diclorometânico e etanólico. Os grupos G2, G3, G4 e G5 foram tratados com EDPV, nas dosagens de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de peso corporal de animal, respectivamente. Os grupos G6, G7, G8 e G9 foram tratados com EEPV, nas dosagens de 100, 200, 300 e 400 mg/kg de peso corporal (mg/kg), respectivamente (Tabela 8).

A administração das doses de extrato de *P. vellosiana* foi realizada diariamente no mesmo horário, durante um período de 28 dias. O cálculo da quantidade de extrato seco administrada foi realizado tendo como referência a média

do peso corpóreo dos animais de cada grupo. A cada 72 horas (três dias), todos os animais foram pesados para o cálculo da quantidade de extrato seco solubilizada em DMSO. Para ressuspensão de cada dose do extrato, foi empregado 1 ml de DMSO por animal, sendo este administrado por técnica de gavagem.

Tabela 10 – Grupos de animais tratados com extratos diclorometânico e etanólico de *P. vellosiana*

Consumo	Grupos	Dose (mg/kg peso corporal)	n
Controle	(G1)	DMSO	7
Extrato Diclorometânico (EDPV)	(G2)	100 + DMSO	7
	(G3)	200 + DMSO	7
	(G4)	300 + DMSO	7
	(G5)	400 + DMSO	7
Extrato Etanólico (EEPV)	(G6)	100 + DMSO	7
	(G7)	200 + DMSO	7
	(G8)	300 + DMSO	7
	(G9)	400 + DMSO	7

DMSO: dimetisufóxido

n: número de animais por grupo

2.2.5. Protocolo de exercício

Os animais foram submetidos a um protocolo de exercício máximo até a exaustão em esteira, como descrito por KOCH & BRITTON (2001), com algumas alterações. A principal modificação do teste foi a utilização do critério de fadiga, e não de exaustão. A fadiga caracteriza-se pela interrupção voluntária do exercício (LAMBERT et al., 2005), seguindo os seguintes critérios: permanência do animal por mais de dez segundos na grade; o animal apoiar as patas traseiras sobre a grade e movimentar apenas as patas dianteiras arrastando sobre a esteira.

O protocolo modificado consistiu de quatro dias seguidos de adaptação à esteira. Durante os quatro dias de adaptação, as variáveis “velocidade” e “tempo de corrida” foram mantidas constantes a 10 metros por minuto (m/min) durante 10 minutos respectivamente. A intensidade aumentou através da elevação da inclinação da esteira. No primeiro dia, ela foi mantida em 0 grau; no segundo, passou para 10 graus; e no terceiro e quarto dias, ficou em 15 graus.

Após 48 horas de descanso do último dia de adaptação, os animais foram submetidos ao teste de exercício máximo, que foi realizado três vezes, em dias

consecutivos, com intervalo de 24 horas entre os testes. Durante o teste, a inclinação da esteira ficou mantida constante em 15 graus, com velocidade inicial de 10ms/min, sendo que, a cada dois minutos a velocidade aumentava em 1 m/min. Foram monitorados o tempo até a fadiga final e a velocidade final atingida pelos animais durante o exercício. As médias dos tempos e velocidades dos três testes foram utilizadas para definir o desempenho dos animais.

2.2.6 Atividade da catalase

Os animais foram submetidos a eutanásia em jejum de 12 horas após um período de 28 dias de consumo dos extratos. A análise da atividade enzimática da catalase foi realizada a partir de amostra do fígado. Para o preparo do homogenado foram seccionadas 100 mg de amostra do fígado congelado (-80°C), colocado em um tubo de ensaio com 1 ml de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) e foi homogeneizado. Em seguida o homogenado foi transferido para Eppendorff de 1,5 mL com auxílio de pipeta automática e centrifugado em centrífuga refrigerada a -4°C, com rotação de 6000 rpm, durante 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi separado e transferido para outro Eppendorff.

O peróxido de hidrogênio (30%) foi diluído em tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2), na proporção de 25 µL de peróxido de hidrogênio(30%) para 25 ml de tampão fosfato.(0,1 M; pH 7,2).

Para leitura da absorbância em espectrofotômetro, foram adicionados 5 µL de amostra do sobrenadante em 2 mL de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2) com peróxido de hidrogênio. As leituras de absorbância foram registradas em três tempos: 0, 30 e 60 segundos após a cubeta ser colocada no espectrofotômetro a 240 nm. Para cada amostra foi preparado um branco para zerar o espectrofotômetro com 5 µL do sobrenadante adicionado a 2 ml de tampão fosfato (0,1 M; pH 7,2). Os resultados foram registrados em unidades de catalase por miligrama de proteína (Ucat./mg de proteína).

2.2.6.1. Dosagem de proteínas totais

Para determinar a concentração de proteína total no homogenado do fígado, foi utilizado o método Lowry et al. (1951). Este método de determinação foi originalmente proposto por WU (1922), sendo esta a metodologia mais utilizada para a determinação de proteínas. O princípio do método baseia-se numa mistura contendo molibdato, tungstato e ácido fosfórico (reagente Folin-Ciocalteu), que sofre uma redução quando reage com proteínas, na presença do catalisador cobre (II), e produz um composto com absorção máxima em 700 nm. As proteínas em solução reagem com o reagente, devido principalmente à tirosina que elas contêm (WU, 1922).

De acordo com metodologia de LOWRY et al. (1951) foi utilizada uma solução ABC, onde a solução A continha 15,0g de carbonato de sódio (Na_2CO_3) e 2,0g de hidróxido de sódio (NaOH) e água para completar 500 mL de volume. A solução B a 2% e a solução C de tartarato de sódio a 4%, ambas em água destilada. A solução D foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck[®]) na diluição de fenol 1 para 2 de água destilada.

Para a curva padrão, foi utilizado o reagente BSA - soroalbumina bovina (140 mg/100mL) da marca Sigma[®] nas seguintes concentrações: 0,04mg; 0,08mg; 0,16mg.; 0,24mg; 0,32mg de BSA. A leitura foi realizada a 700 nm.

Diante da curva padrão, foram realizadas em triplicatas as análises das amostras do homogenado do fígado. Para o branco foram colocados em tubos de ensaio 125 μL de água mais 1.250 μL de solução ABC, sendo esta utilizada para zerar o aparelho na hora da leitura. Para as amostras, foram colocadas separadamente em tubos de ensaio 125 μL de homogenado do fígado (diluído 15x) mais 1.250 μL de solução ABC. Os tubos contendo o branco e as amostras foram homogeneizados em vortex e colocados em repouso por 10 minutos. Após o tempo, foi colocado em cada tubo de ensaio 125 μL de reagente Folin-Ciocalteu diluído e novamente homogeneizados em vortex e colocados em repouso por 10 minutos para posterior leitura em espectrofotômetro a 700nm.

2.3. Análise estatística

Os dados obtidos foram interpretados por meio da PROC-GLM, e as médias dos grupos experimentais foram comparadas com extrato DMSO pelo teste de Dunnett, adotando-se 5% de probabilidade.

As análises estatísticas dos dados foram feitas utilizando-se o programa SAS (Statistical Analysis Systems Institute), versão 8.2 (2001).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Atividade antioxidante *in vitro*

Para o EDPV não foi possível analisar a atividade antioxidante pelo método de retirada de radical livre DPPH das amostras no espectrofotômetro em absorvância de 517nm, devido à intensa coloração causada pela presença de pigmentos. Várias tentativas de reduzir esta coloração foram realizadas utilizando as técnicas de partição com solvente de característica apolar e tratamento utilizando carvão ativado, não obtendo sucesso.

A análise quantitativa da atividade antioxidante do EEPV foi determinada pelo método de retirada de radical livre DPPH. Foram realizadas leituras em um espectrofotômetro na absorvância de 517 nm e determinou-se a IC₅₀.

Conforme a Figura 10, observa-se que os valores de concentração apresentados para IC₅₀ do EEPV é próximo ao valor do padrão (BHT) utilizado neste estudo. As concentrações de EEPV e do padrão (BHT) que foram capazes de reduzir a concentração inicial do DPPH em 50% (IC₅₀) foram de 13,54 µg/mL e 11,93µg/mL, respectivamente.

Ao confrontar a concentração de potencial antioxidante para IC₅₀ do EEPV, este demonstrou ser mais promissor do que a concentração de potencial antioxidante para IC₅₀ demonstrado pelo extrato das folhas da *Psychotria prunifolia*. O valor concentração encontrado para esta espécie foi de 231 µg/mL (FARIA, 2009). Porém, ao confrontar a concentração do potencial antioxidante (IC₅₀) com espécies da mesma família (*rubiaceae*), o valor de concentração é semelhante. Como exemplo pode-se citar o extrato bruto metanólico de *Chomeli obtusa* com valor de 15,19µg/mL.

O potencial antioxidante *in vitro* demonstrado pelo EEPV pode ser atribuído em grande parte aos flavonoides, aos compostos denominados fenólicos, mas não de forma exclusiva, já que ocorre um sinergismo entre os vários composto existentes no EEPV, que também pode ser importante para determinar o potencial antioxidante (LIMA et AL., 2006). A atividade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser atribuída à capacidade de oxi-redução, que é um processo importante para a adsorção ou neutralização dos radicais livres (BRASILE et al., 2005).

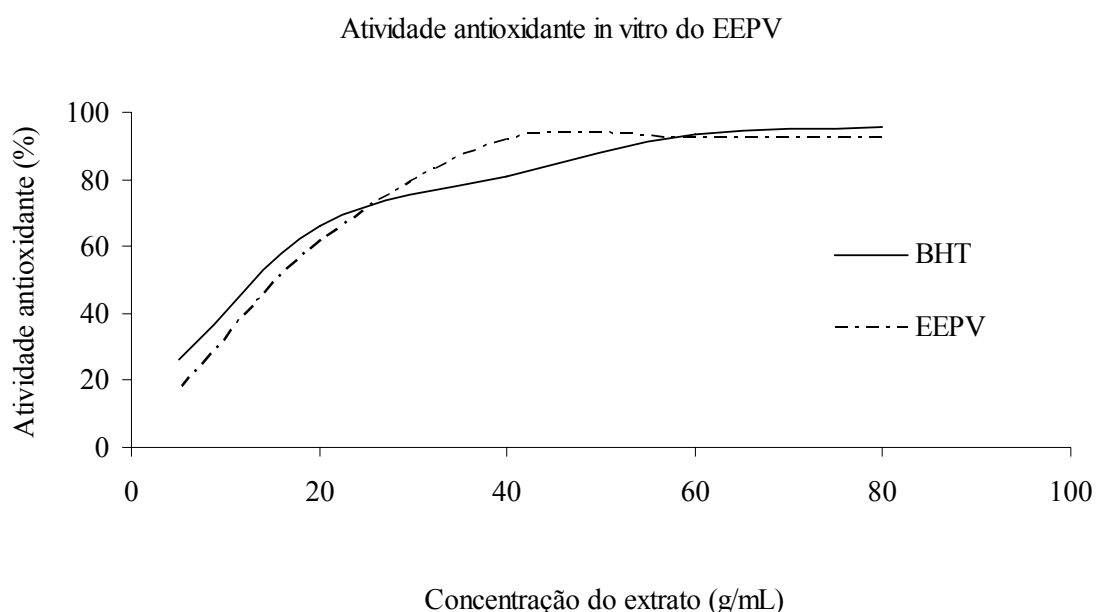


Figura 10 (a) – Potencial antioxidante *in vitro* pelo método de DPPH.

BHT: hidroxitolueno butilado e EEPV: extrato etanólico de *Psycotria vellosiana*

3.2. Efeito dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* sobre atividade de catalase

3.2.1 Catalase

Neste estudo foi avaliado o efeito dos extratos diclorometânico e etanólico das folhas de *P. vellosiana* sobre a atividade da catalase hepática dos animais. Este efeito foi analisado porque foram identificados compostos que possuem capacidade de modulação sobre o mecanismo antioxidante endógeno, como os flavonóides, que têm

sido referenciados como os principais compostos com poder antioxidante (RUDNICH, 2005; FARIAS, 2006).

Na Tabela 9 estão representados os valores médios da atividade da catalase hepática dos animais avaliados.

Tabela 11 - Valores médios da atividade da catalase hepática de ratos tratados, durante 28 dias, com diferentes doses de extrato diclorometânico e etanólico de *P. vellosiana*, após teste de corrida máxima em esteira

Tratamentos	Grupos	Doses (mg/kg de peso corporal)	Catalase (Ucat/mg)	n
Controle	G1	0	0,192 ± 0,06	6
	G2	100	0,128 ± 0,04	6
Extrato Diclorometânico (EDPV)	G3	200	0,119 ± 0,01	4
	G4	300	0,177 ± 0,03	6
	G5	400	0,237 ± 0,03	6
	G6	100	0,123 ± 0,01*	6
Extrato Etanólico (EEPV)	G7	200	0,106 ± 0,02*	6
	G8	300	0,103 ± 0,01*	6
	G9	400	0,163 ± 0,04	7

Os resultados estão expressos como média±desvio padrão, em unidades de catalase por miligramas de proteína (Ucat/mg). n= número de animais por grupo.

* significativo pelo teste Dunnett a 5% de probabilidade

Sobre os efeitos do treinamento físico e dos testes exaustivos aplicados em animais de corrida em esteira e natação, os resultados apontam para alterações da atividade enzimática da catalase hepática. O treinamento progressivo em esteira, durante 10 semanas, aumentou significativamente os níveis de expressão do RNA mensageiro da enzima catalase nas células hepática de ratos (WILSON & JOHNSON, 2000). Além disso, os valores de atividade da catalase para ratos, fêmeas e machos, aumentaram significativamente em órgãos como rins, intestino, coração e fígado, imediatamente após 1 hora de sessão exaustiva em natação (TERBLANCHE, 1999).

O envelhecimento reduz significativamente a atividade da catalase hepática de ratos, que, quando submetidos ao treinamento em natação de uma hora por dia, durante cinco dias da semana, por um ano, elevam significativamente os valores da atividade da catalase hepática, aproximando-as dos valores de ratos jovens (GUNDUZ et al., 2004).

Para todos os grupos do EDPV (Tabela X), a atividade enzimática da catalase reduziu, porém não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) quando

comparada à do grupo controle (dose 0). Os valores médios apresentados foram de 0.128 ± 0.043 , 0.119 ± 0.019 , 0.177 ± 0.037 e 0.237 ± 0.039 Ucat/mg de proteína, respectivamente, para as doses 100, 200, 300 e 400 mg/kg. O grupo controle (dose 0) apresentou valor médio de 0.192 ± 0.0656 Ucat/mg de proteína.

Para os grupos do EEPV (Tabela 9), as doses 100, 200 e 300 mg/kg tiveram a atividade enzimática da catalase reduzida significativamente ($P < 0,05$), quando comparadas com grupo controle (dose 0). Os valores médios apresentados foram de 0.123 ± 0.019 , 0.106 ± 0.020 , 0.103 ± 0.012 e 0.163 ± 0.04 Ucat/mg de proteína, respectivamente para as doses de 100, 200, 300 e 400 mg/kg. O grupo controle (dose 0) apresentou valor médio de 0.192 ± 0.0656 Ucat/mg de proteína.

Alguns resultados indicaram que o aumento dos níveis de atividade da catalase hepática possa ser uma resposta do mecanismo antioxidante endógeno contra o efeito deletério das espécies reativas de oxigênio nas células hepáticas, reduzindo a concentração de H_2O_2 , que é quebrada em H_2O e O_2 . (TERBLANCHE, 1999; WILSON & JOHNSON, 2000). Mesmo considerando a discussão anterior, os resultados reportados neste estudo sobre a redução significativa da atividade da catalase hepática (doses 100, 200 e 300 mg/kg) do EEPV, podem ser explicados pela possibilidade de ter ocorrido um menor acúmulo de peróxidos de hidrogênio nos fígados dos animais, que independente da quantidade produzida no teste exaustivo de corrida em esteira, o peróxido de hidrogênio pode ter sido quebrado em H_2O e O_2 devido o potencial de ação antioxidante dos extratos EEPV nessas concentrações.

O grande potencial (IC_{50}) *in vitro* apresentado pelo EEPV e os resultados apresentados por outros estudos (VALÉRIO et al., 2001; KAMPKOTTER et al., 2007) corroboram para a possibilidade de que o EDPV nessas concentrações tem capacidade de eliminar radicais livres ou alterar a expressão de genes cujos produtos agem aumentando a defesa antioxidante da célula. Ressalta-se que não foi objetivo deste estudo definir qual mecanismo destas vias foi utilizado pelo EEPV para reduzir a atividade antioxidante.

Sobre os efeitos dos extratos de espécies vegetais na atividade da catalase hepática, o consumo durante 30 dias de $1g \cdot kg^{-1}$ de peso vivo, do extrato da casca de *Syzugium cumini*, aumentou significativamente a atividade da catalase hepática e renal de ratas normais e diabéticas (MAZANTTI et al., 2003). Além disso, o tratamento com 80 mg/kg de peso corporal, do extrato etanólico de curcumin

(pigmento amarelo isolado dos rizomas das plantas *Curcuma longa*) durante 28 dias em ratos diabéticos, reduziu significativamente os valores de atividade da catalase hepática e renal (HUSSEIN & ABU-.ZINADAH, 2010).

Os resultados apresentados no parágrafo anterior podem corroborar com o entendimento das respostas da atividade da catalase hepática para os grupos de animais tratados com as doses de 100, 200 e 300 mg/kg de peso corporal do EEPV. Lembrando que a atividade da catalase hepática foi reduzida e, supostamente em resposta ao teste de corrida máxima em esteira, poderia ter aumentado a atividade. Entretanto, os estudos realizados por Mazanti et al., (2003) e Hussein & Abu-zinadah (2010), observaram que ocorreu efeito de redução da atividade da catalase hepática em resposta ao tratamento com extratos de espécies vegetais.

4. CONCLUSÃO

O EEPV foi capaz de reduzir a concentração inicial do DPPH em 50% (IC₅₀), na concentração de 13,54 µg/mL, este valor de concentração foi próximo ao valor de concentração apresentado pelo padrão BHT (11,93µg/m). Este resultado confirma o potencial antioxidante *in vitro* do EDPV.

Os resultados significativos foram a redução da atividade da catalase hepática para as doses de 100, 200 e 300 mg/kg do extrato etanólico das folhas de *P. vellosiana* (EEPV). Estes resultados podem ser explicados pelo potencial antioxidante do EEPV, que, via mecanismo antioxidante não-enzimático de proteção do organismo contra os efeitos deletérios das EROs, não permitiu o acúmulo do peróxido de hidrogênio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16 (Supl.), p.678-689, 2006.
- BASILE, A.; FERRARA, L.; DEL POZZO, M.; MELE, G.; SORBO, S.; BASSI, P.; MONTESANO, D. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from *Paullinia cupana Mart.* **Journal of Ethno-pharmacology**, v.102, p.32-36, 2005.
- FARIA, E.O. **Estudo fitoquímico das folhas da espécie *Psychotria prunifolia* (Kunth) Steyerm (Rubiaceae)**. Goiânia, GO: UFG, 2009, 126p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Goiás, 2009.
- FARIAS, F.M. ***Psychotria myriantha* Müll. Arg. (Rubiaceae): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiquimiotáxica e sobre o sistema nervoso central**. Porto Alegre, R.S.: UFRGS, 2006, 191p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.
- FINKEL T. Oxidant signals and oxidative stress. **Current Opinion in Cell Biology**, v.15, n.2, p.247-254, 2003.
- GONZALEZ, N.C.; KIRKTON, S.D.; HOWLETT, R.A.; BRITTON, S.L.; KOCH, LG.; WAGNER, H.E.; WAGNER, P.D. Continued divergence in VO_{2max} of rats artificially selected for running endurance is mediated by greater convective blood O_2 delivery. **J. Appl. Physiol.** 101: 1288-1296, 2006.
- GUNDUZ, F.; SENTÜRK, Ü. K.; KURU, O; AKTEKIN, B.; AKTEKIN, M.R. The effects of one year swimming exercise on oxidant stress and antioxidant capacity in aged rats. **Physiology Research**, v.53, p.171-176, 2004.
- HALLIWELL B.; GUTTERIDGE J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 2nd Oxford: Clarendon Press, 1989.
- HENDERSON, K.K.; WAGNER, H.E.; FAVRET, F.; BRITTON, S.L.; KOCH, LG.; WAGNER, P.D.; GONZALEZ, N.C. Determinants of maximal O_2 uptake in rats selectively bred endurance running capacity. **J Appl Physiol.** 93: 1265-

1274, 2002.

- HOWLETT, R.A.; GONZALEZ, N.C.; WAGNER, H.E.; FU, Z.; BRITTON, S.L.; KOCH, L.G.; WAGNER, P.D. Skeletal muscle capillarity and enzyme activity in rats selectively bred for running endurance. **J. Appl. Physiol.** 94: 1682-1688, 2003.
- HUSSAIN, S.O.; BARBATO, J.C.; KOCH, L.G.; METTING, P.J.; BRITTON, S.L. Cardiac function in rats selectively bred for low- and high-capacity running. **Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol.** 281: R1787-R1791, 2001.
- HUSSEIN, H. K.; ABU-ZINADAH, O. A. Antioxidant effect of curcumin extracts in induced diabetic wister rats. **International Journal of Zoological Research.** v.6, n.4, p.266-276, 2010.
- KAMPKÖTTER, A.; PIELARSKI, T.; ROHRIG, R.; TIMPEL, C.; CHOVOLOU, Y.; WÄTJEN, W.; KAHL, R. The Ginkgo biloba extract EGb761 reduces stress sensitivity, ROS accumulation and expression of catalase and glutathione S-transferase 4 in *Caenorhabditis elegans*. **Pharmacological Research**, v.55, n.2, p.139-147, 2007.
- KOCH, L.G.; BRITTON, S.L. Artificial selection for intrinsic aerobic endurance running capacity in rats. **Physiological Genomics**, v.5, n.1, p.45-52, 2001.
- LAMBERT, E.V.; CLAIR GIBSON, A.S.; NOAKES, T.D. Complex systems model of fatigue: integrative homeostatic control of peripheral physiological systems during exercise in humans. **British Journal of Sports Medicine**, v.39, n.1, p.52-62, 2005.
- LIMA, A.R.; BARBOSA, V.C.; FILHO, P.R.S.; GOUVÊA, C.M.C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.4, p.531-536, 2006.
- LIMA, M.M.O.; VIEIRA, L.F.; COSTA JUNIOR, J.S. Avaliação da atividade antioxidante de *Platonia iignis* Mart. (Clusiaceae). In: II Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 2007, João Pessoa. **Resumos...** João Pessoa: 2007. p.1-6.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Biochemistry**, v.193, p.265-275, 1951.
- MAZZANTI, C. M.; SCHOSSLER, D. R.; FILAPPI, A.; PRESTES, D.; BALZ, D.; MIRON, V.; MORSCH, A.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; CECIM, M. Extrato da casca de *Syzygium cumini* no controle da glicemia e estresse oxidativo de ratos normais e diabéticos. **Ciência Rural**, v.33, n.6, p. 1061-1065, 2003.
- NETTO Jr., J.; BRAILE, D. M.; CECCHINI, R.; CICOGNA, A. C.; GUARNIER, F. A.; PASTRE, C. M.; OLIVEIRA JR., S. A.; SUGISAKI, M.; PASTRE, E. C. Comportamento da produção de espécies reativas de oxigênio em miocárdio de

- ratos submetidos a treinamento de baixa intensidade em diferentes temperaturas. **Revista Brasileira de Medicina do Esporte**, v.13, n.6, p.411-415, 2007.
- PRADO, A. C. P.; ARAGÃO, A. M.; FETT, R.; BLOCK, J. M. Compostos fenólicos e atividade antioxidante de extratos da casca de noz-pecã [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch]. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.12, n.4, p.323-332, 2009.
- RIBEIRO, S.M.R.; QUEIROZ, M.E.L.R.; PELUZIO, M.C.G.; COSTA, N.M.B.; MATTA, S.L.P.; QUEIROZ, J.H. Antioxidantes da dieta. In: COSTA, N.M.B.; PELUZIO, M.C.G. (Eds.) **Nutrição Básica e Metabolismo**, 1.ed. Viçosa: UFV, p.382-400, 2008.
- RUDNICK, MARTINA. **Propriedades antioxidantes de extratos de *Passiflora alata* Dryander e de *Passiflora edulis* Sims**. Porto Alegre, R.S.: UFRGS, 2005, 89p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Bioquímica) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2005.
- SOUSA, C.M.M.; SILVA, H.R.; VIEIRA-Jr., G.M.; AYRES, M.C.; COSTA, C.L.S.; ARAUJO, D.S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v.30, n.2, p.351-355, 2007.
- TERBLANCHE, S. E. The effects of exhaustive exercise on the activity levels of catalase in various tissues of male and female rats. **Cell Biology International**, v.23, n.11, p.749-753, 1999.
- VALÉRIO, L.G. Jr.; KEPA, J.K.; PICKWELL, G.V.; QUATTROCCI, L.C. Induction of human NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO1) gene expression by the flavonol quercetin. **Toxicology Letters**, v.119, n.1, p.49-57, 2001.
- VICENTINO, A.R.R.; MENEZES, F.S. Atividade antioxidante de tinturas vegetais, vendidas em farmácias com manipulação e indicadas para diversos tipos de doenças pela metodologia do DPPH. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.3, p.384-387, 2007.
- WILSON, D. O.; JOHNSON, P. Exercise modulates antioxidant enzyme gene expression in rat myocardium and liver. **Journal Applied Physiology**, v.88, p.1791-1796, 2000.
- WU, H. A new colorimetric method for the determination of plasma proteins. **The Journal of Biological Biochemistry**, v.51, p.33-39, 1922.

CONCLUSÕES GERAIS

Os extratos diclorometânico e etanólico das folhas da espécie *P. vellosiana* apresentaram importantes metabólitos secundários, além do valor considerável de proteínas e presença de minerais importantes para o organismo. Não foi observado efeito de melhora de desempenho dos ratos no exercício máximo exaustivo de corrida em esteira para nenhuma das variáveis avaliadas. Não foram verificados sinais de toxicidade e de alterações metabólicas dos ratos tratados com os extratos nas doses testadas. O extrato etanólico das folhas de *P. vellosiana* apresentou forte atividade antioxidante *in vitro* e capacidade de reduzir a atividade da catalase hepática de ratos .

APÊNDICE

Tabela 1A. Resumo do PROC GLM para as variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) e variação do lactato sanguíneo (VLS) com diferentes doses de extrato diclorometânico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	VFA		TTC		VLS	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Doses	4	1,1687	4	3,0072	4	1,0006
Resíduo	16	1,1498	15	3,6413	14	0,4201

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 2A. Resumo do PROC GLM para as variáveis tempo total de corrida (TTC), velocidade final atingida (VFA) e variação do lactato sanguíneo (VLS) com diferentes doses de extrato etanólico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	VFA		TTC		VLS	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Doses	4	3,6843	4	11,8811	4	0,5203
Resíduo	11	2,7883	10	10,8311	12	0,6418

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 3A. Resumo do PROC GLM para as variáveis de peso corporal total (PCT), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) com diferentes doses de extrato diclorometânico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	G.L.	QM		
		PCT	PF	PC
Doses	4	670,4816	0,4068	0,0716*
Resíduo	28	950,2840	0,8858	0,0205*

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 4A. Resumo do PROC GLM para as variáveis ganho de peso corporal total (PCT), peso do fígado (PF) e peso do coração (PC) com diferentes doses de extrato etanólico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	G.L.	QM		
		PCT	PF	PC
Doses	4	279,4129	0,3307	0,0379
Resíduo	24	1050,5461	1,3941	0,0203

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 5A. Resumo do PROC GLM para as variáveis glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com diferentes doses de extrato diclorometânico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	Glicose		Triglicerídeos		Colesterol Total		Creatinina		ALT		AST	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	4	587,3062	4	2074,2343	4	2636,3535	4	0,0673*	4	501,7833	4	1432,3714
Resíduo	21	588,9085	21	1093,9785	21	1836,2404	20	0,0130*	19	233,8000	16	856,3417

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 6A. Resumo do PROC GLM para as variáveis glicose, triglicerídeos, colesterol total, creatinina, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) com diferentes doses de extrato etanólico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	Glicose		Triglicerídeos		Colesterol Total		Creatinina		ALT		AST	
	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM	GL	QM
Tratamentos	4	1866,0919*	4	1037,7934*	4	211,7190	4	0,0247	4	786,0238	4	2855,3839
Resíduo	25	328,9986*	26	335,2665*	26	224,9166	26	0,0344	25	194,9029	23	802,4969

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 7A. Resumo do PROC GLM para a variável catalase com diferentes doses de extrato diclorometânico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	G.L.	QM CAT
Doses	4	0,0126*
Resíduo	23	0,0020*

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

Tabela 8A. Resumo do PROC GLM para a variável catalase (CAT) com diferentes doses de extrato etanólico de *P. vellosiana* durante o teste de corrida em esteira

Fonte Variação	G.L.	QM CAT
Doses	4	0,0091*
Resíduo	26	0,0016*

^{ns}: não significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F

*: significativo ao nível de 5% de probabilidade pelo teste F