



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETÍLICO DE FOLHAS DE *Salix*
humboldtiana EM MODELO ZEBRAFISH
(*Danio rerio*)**

UÊBEM FERNANDES RAMOS

BELÉM – PARÁ
2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETÍLICO DE FOLHAS DE *Salix*
humboldtiana EM MODELO ZEBRAFISH**

(Danio rerio)

Autor: Uêbem Fernandes Ramos

Orientador: Prof.Tit.Dr. Wagner L. Ramos Barbosa

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará (PPGCF-UFPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Fármacos e Medicamentos.

Linha de Pesquisa: Desenvolvimento e Avaliação de Medicamentos Naturais e Sintéticos.

BELÉM – PARÁ

2020

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará
Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a)
autor(a)

R175i RAMOS, UEBEM,
INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE ANTI-INFLAMATORIA DO EXTRATO
HIDROETÍLICO DE FOLHAS DE *Salix humboldtiana* EM
MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*) / UEBEM RAMOS. —
2020.
116 f.

Orientador(a): Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará,
Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação
em Ciências Farmacêuticas, Belém, 2020.

1. *Salix humboldtiana*. 2. fitoquímica. 3. atividade
anti-inflamatória. 4. modelo zebrafish. 5. *Danio rerio*. I.
Título.

CDD 610

UÊBEM FERNANDES RAMOS

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETÍLICO DE FOLHAS DO *Salix humboldtiana* EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará (PPGCF-UFGPA) como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 25 de setembro de 2020

Banca Examinadora

Prof.Tit.Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa (PPGCF/UFGPA)
Orientador

Prof^a.Dra. Marcieni Ataíde de Andrade (PPGCF/UFGPA)
1^o Examinadora

Prof^a.Dra. Andressa Santa Brígida da Silva (UNAMA)
2^o Examinadora

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, quero agradecer a DEUS, acima de tudo, sua misericórdia, amor e bondade incalculável. Principalmente, pelas suas bênçãos diárias e pela força que me permitiu continuar nessa caminhada difícil, porém desafiadora.

À minha família, principalmente, você Orlandina Ramos, uma mulher guerreira, uma mãe maravilhosa, dedicada que sempre apoiou meus estudos e deu incentivos para buscar desde criança, melhorias, através da educação. Meu irmão Wilson Ramos é um exemplo para mim. Obrigado por todas as vezes que acreditaram em mim. Sempre me ajudando em tudo que precisei. Eu amo profundamente vocês.

Meu grande professor Wagner Barbosa, por quem tenho grande respeito e admiração pessoal, me espelho como profissional, professor e pesquisador. Eu já era apaixonado por tudo relacionado às plantas medicinais e fitoterapia, desde a graduação em Enfermagem e Farmácia, mas através dele, me aprofundi no assunto. Obrigado pela oportunidade de fazer parte da sua equipe, pela confiança, paciência, ensinamentos e orientação. Sou eternamente grato.

Ao GTWB: Sarah, Isis, Jailton, e de outros que eu possa ter esquecido de citar, meu muito obrigado! A presença de vocês fez do laboratório um ambiente agradável e produtivo. Levarei na lembrança a amizade, a ajuda e a troca de conhecimento.

Em especial, gostaria de agradecer a duas personagens importantes nessa história, que fizeram total diferença: minha colega Myrth que me ajudou desde o início (na elaboração do projeto de pesquisa) ainda nas etapas do processo seletivo, sem você não teria conseguido. E a Ianna, você fez a diferença, tenho muita consideração e carinho por tudo que você me ajudou, obrigado por toda atenção e por compartilhar conhecimento comigo. Nunca se negou, em momento algum, a me ajudar. Gostaria de agradecer à equipe do Laboratório de Pesquisa em Fármacos, da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), sob supervisão do Prof.Dr. José Carlos Tavares Carvalho. Para encerrar, meus agradecimentos são para todos os professores e secretaria do PPGCF da UFPA.

Muito obrigado!

“Um exemplo abre a mente, uma história abre o coração e a motivação abre o caminho”.

(Uêbem Ramos)

“Todos querem ganhar medalhas de ouro, mas poucos querem treinar na intensidade necessária para conquistá-las”.

(Mark Spitz)

RESUMO

RAMOS, U.F. **INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETÍLICO DE FOLHAS DO *Salix humboldtiana* EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)**. Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2020.

As folhas do *Salix humboldtiana*, família Salicaceae, são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, estados febris, entre outras. Porém, existem poucas informações sobre a espécie na literatura. Todavia, o gênero *Salix* apresenta uma diversidade bastante significativa de usos na medicina popular, tendo na espécie *Salix alba* L. o seu mais consagrado representante, que está incluído no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Este trabalho se propõe a investigar os constituintes químicos com ênfase nos compostos fenólicos, através de estudos farmacognósticos (análise de qualidade físico-químico); abordagem fitoquímica, os testes, serviram para demonstrar a presença de classes de metabólitos secundários: açúcares redutores, fenóis e taninos, flavonoides, catequinas, esteróides e derivados de cumarina; fracionamento, CCD e CLAE-DAD. Além de teste biológico em modelo animal (*D. rerio*) para investigação das atividades anti-inflamatórias. Neste sentido, os objetivos de realizar as análises fitoquímicas e o bioensaio, foi utilizado o Extrato etílico do *Salix humboldtiana* (EBSH) nas diferentes doses em testes *in vivo*. Os grupos previamente tratados com EBSH 75 mg/kg apresentaram inibição de 5%; 150 mg/kg apresentaram inibição de 14%; 300 mg/kg apresentaram inibição de 54%; 500 mg/kg apresentaram inibição de 60%, 750 mg/kg apresentaram inibição de 43% de edema abdominal em comparação ao controle negativo. Entre as cinco diferentes concentrações do EBSH testados e avaliados no modelo zebrafish, a concentração de 500 mg, forneceu resposta estatisticamente mais expressiva quanto à atividade anti-inflamatória e grau anti-edematogênico após 5 h de tratamento. Essa resposta foi superior ao padrão indometacina se comparados ao controle negativo, indicando dessa forma a capacidade de redução e/ou inibição do edema na região peritoneal. Os animais submetidos aos ensaios apresentaram alterações no comportamento normal em todas as doses testadas, essas alterações variaram de acordo com a concentração do EBSH administrada. Nas três menores doses (75 mg, 150 mg e 300 mg), os peixes apenas manifestaram alterações leves à moderadas e em menor frequência, enquanto nas duas concentrações maiores (500 mg e 750 mg), eles manifestaram importantes alterações comportamentais, algumas com maior frequência e intensidade.

Palavra-chave: *Salix humboldtiana*; fitoquímica; atividade anti-inflamatória; extrato hidroetanólico; modelo zebrafish; *Danio rerio*.

ABSTRACT

RAMOS, U.F. **PHYTOCHEMICAL INVESTIGATION AND EVALUATION OF THE ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF THE HYDROETHANOLIC EXTRACT OF LEAVES OF THE SALIX HUMBOLDTIAN IN ZEBRAFISH MODEL (*Danio rerio*)**. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Federal University of Pará, Belém, 2020.

The leaves of *Salix humboldtiana*, family Salicaceae, are used in traditional medicine for the treatment of various inflammatory diseases, febrile states, among others. However, there is little information about the species in the literature. However, the genus *Salix* has a very significant diversity of uses in popular medicine, with *Salix alba* L. as its most renowned representative, which is included in the Brazilian Pharmacopoeia Form of Herbal Medicine. This work proposes to investigate chemical constituents with an emphasis on phenolic compounds, through pharmacognostic studies (analysis of physical-chemical quality); the phytochemical approach, the tests, served to demonstrate the presence of classes of secondary metabolites: reducing sugars, phenols and tannins, flavonoids, catechins, steroids and coumarin derivatives; fractionation, CCD and CLAE-DAD. In addition to biological testing on an animal model (*D. rerio*) to investigate anti-inflammatory activities. In this sense, the objectives of performing the phytochemical analyzes and the bioassay, the *Salix humboldtiana* Ethyl Extract (EBS_h) was used in different doses in *in vivo* tests. Groups previously treated with 75 mg / kg EBS_h showed 5% inhibition; 150 mg / kg showed 14% inhibition; 300 mg / kg showed 54% inhibition; 500 mg / kg showed 60% inhibition, 750 mg / kg showed 43% inhibition of abdominal edema compared to the negative control. Among the five different concentrations of EBS_h tested and evaluated in the zebrafish model, the concentration of 500 mg, provided a statistically more expressive response regarding anti-inflammatory activity and anti-edematogenic degree after 5 h of treatment. This response was superior to the indomethacin standard when compared to the negative control, thus indicating the ability to reduce and / or inhibit edema in the peritoneal region. The animals subjected to the tests showed changes in normal behavior at all doses tested, these changes varied according to the concentration of EBS_h administered. In the three lowest doses (75 mg, 150 mg and 300 mg), the fish showed only mild to moderate changes and less frequently, while in the two highest concentrations (500 mg and 750 mg), they manifested important behavioral changes, some with greater frequency and intensity.

Keywords: *Salix humboldtiana*; phytochemistry; antiinflammatory activity; hydroethanolic extract; zebrafish model; *Danio rerio*.

FIGURAS

Figura 1. Distribuição geográfica da família Salicaceae	21
Figura 2. Distribuição geográfica do gênero Salix	22
Figura 3. Distribuição geográfica da espécie <i>Salix humboldtiana</i>	24
Figura 4. Habitats naturais	26
Figura 5. Morfologia vegetal: Tronco com casca grossa de cor cinza (A); Copa ampla e com ramificações (B)	27
Figura 6. Morfologia das folhas: ramos (A); disposição (B)	27
Figura 7. Particularidades botânicas Inflorescência (A); fruto (B)	27
Figura 08. Estrutura básica dos compostos fenólicos (A) ; Estrutura básica dos glicosídeos (B)	29
Figura 09. Estruturas moleculares: Polifenol (A) ; Isoquercetina (Polifenol glicosilado) (B)	30
Figura 10. Classificação dos compostos fenólicos	30
Figura 11. Estrutura química e equação do ácido salicílico ácido acetilsalicílico	31
Figura 12. Habitat natural do zebrafish (regiões alagadiças)	32
Figura 13. <i>Danio rerio</i> (zebrafish)	33
Figura 14. Mecanismo do processo inflamatório	34
Figura 15. Sinais cardinais da inflamação	35
Figura 16. Folhas de <i>Salix humboldtiana</i> : Copa da árvore (A); Exsicata (B)	38
Figura 17. Solventes de polaridade crescente (Método de Fracionamento)	48
Figura 18. Fluxograma	49
Figura 19. Plataforma Zebrafish – UNIFAP.....	54
Figura 20. Infraestrutura dos Biotérios (Sistema de Alojamento para Zebrafish)	55
Figura 21. Tripé dos equipamentos do sistema zebrafish nos aquários/biotérios	56
Figura 22. Esquema das concentrações dos extratos de <i>Salix humboldtiana</i>	58
Figura 23. Procedimento de separação individual do zebrafish	61
Figura 24. Fluxograma do passo a passo do processamento do material vegetal (extração e rendimento)	66
Figura 25. Gráfico quantidade de pó retido X tamanho do tamis	68

Figura 26. Fracionamento e o rendimento das frações de acordo com a polaridade crescente dos solventes orgânicos	77
Figura 27. Estrutura química de um flavonoide com as partes que originam as bandas de absorção características no UV	81
Figura 28. Pico 1 - Sobreposição de cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. EBSH (vermelho) e substância referência catequina (azul), detecção no comprimento de onda de 280 nm (Espectro)	82
Figura 29. Perfil cromatográfico do EBSH obtido por CLAE-DAD com detecção no comprimento de onda de 330 nm. Pico 1' e Pico 2' com seus respectivos espectros A e B	83
Figura 30. Cromatograma da fração hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 250 nm	84
Figura 31. Espectro nos diferentes tempos de retenção da fração hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 250 nm	85
Figura 32. Cromatograma da fração hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 280 nm	85
Figura 33. Cromatograma da fração hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 330 nm	85
Figura 34. Esquema das concentrações dos extratos de <i>Salix humboldtiana</i>	87
Figura 35. Gráfico do Efeito do tratamento oral Extrato hidroetílico no edema induzido por carragenina em peixe-zebra (<i>D. rerio</i>)	89
Figura 36. Estágios comportamentais do zebrafish	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Índice de espuma	45
Tabela 2. Condição da eluição gradiente CLAE-DAD	51
Tabela 3. Parâmetros: níveis adequados e frequência de testes recomendados para o zebrafish	55
Tabela 4. Grupos de administração	57
Tabela 5. Etapas do processamento e rendimento da matéria-prima vegetal, droga e extrato	64
Tabela 6. Análise granulométrica das folhas do <i>Salix humboldtiana</i>	67
Tabela 7. Análise farmacognóstica do pó das folhas do <i>Salix humboldtiana</i>	72
Tabela 8. Rendimento das frações Hexânica (FHS _h), Diclorometano (FDS _h), Acetato de Etila (FAS _h) e Metanólica (FMS _h) do extrato do <i>S. humboldtiana</i>	78
Tabela 9. Análise dos compostos fenólicos em CCD	79
Tabela 10. Padrões e tempo de retenção das amostras em CLAE-DAD.....	83
Tabela 11. Grupo de tratamento	87
Tabela 12. Avaliação das alterações comportamentais do <i>D. rerio</i> diante das diferentes concentrações do EBHS _h testadas e os variados intervalos observados (horas)	94

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Lista de Fitoterápicos distribuídos pelo SUS	20
Quadro 2. Teste de triagem fitoquímica	47
Quadro 3. Cuidados, etapas e procedimentos nos testes em zebrafish	59
Quadro 4. Análise comportamental do zebrafish em 4 estágios	61
Quadro 5. Resultado da Prospecção fitoquímica	74
Quadro 6. Etograma comportamental do zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	91

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1. Percentual (%) retida pelos tamises	41
Equação 2. Densidade aparente	43
Equação 3. Determinação do teor de cinzas totais	43
Equação 4. Índice de Espuma	45
Equação 5. Medida do edema	60
Equação 6. Teste <i>t</i> de <i>Student</i>	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
AINEs	Anti-Inflamatório Não-Esteroidais
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLAE-DAD	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência e Detecção de Arranjo de Diodos
COX	Ciclooxigenase
DPPH	2,2-difenil-1- (2,4,6-trinitrofenil) hidrazila
D. rerio	<i>Danio rerio</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico / deoxyribonucleic acid
EBSH	Extrato Bruto Hidroetílico de <i>Salix humboldtiana</i>
FFFB	Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira
FASh	Fração acetato de etila
FDSH	Fração diclorometano
FHSh	Fração hexânica
FMSH	Fração metanólica
HPLC	High-performance liquid chromatography
ICS	Instituto de Ciências da Saúde
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente
iNOS	Óxido nítrico sintases
IPNI	<i>International Plant Names Index</i>
IV	Infravermelho
LACREM	Laboratório de cromatografia líquida e espectrometria de massas
LAFQ	Laboratório de fitoquímica
MS	Ministério da Saúde
OMS/WHO	Organização Mundial de Saúde / World Health Organization
PBS	Tampão fosfato-salino / phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico ou potencial de hidrogênio
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PTF	Produtos Tradicionais Fitoterápicos
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
RENAFITO	Relação Nacional de Fitoterápicos
Rf	<i>Retention factor</i> (Fator de retenção)
SUS	Sistema Único de Saúde
Tf	Tempo de retenção
TGI	Trato Gastrointestinal
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa / Alpha Tumor Necrosis Factors
UV	Ultravioleta
UFMS	Universidade Federal do Mato Grosso do Sul
UFPA	Universidade Federal do Pará
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
Vis.	Visível

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

α	Alfa
β	Beta
g	Gramma
G	Gauge
h	Hora
kg	Quilograma
L	Litro
μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrômetro
μs	Microsegundos
M	Massa
m	Concentração molar
MHz	Mega Hertz
mL	mililitro
mM	milimolar
mol/L	mol/litro
Min.	Minuto
M/v	massa por volume
nm	Nanômetro
Ph	Potencial hidrogeniônico
P/v	Peso por volume
rpm	Rotações por minuto
seg.	Segundos
v/v	volume por volume
λ	Comprimento de onda
%	Porcentagem
°	Graus
°C	Graus Celsius
+	Positivo
-	Negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA NO BRASIL	18
2.1.1 Perspectiva histórica no uso das plantas medicinais e fitoterapia	18
2.1.2 Regulamentação e normatização: Controle de qualidade e padronização das plantas medicinais e fitoterapia no Brasil	19
2.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DO <i>Salix humboldtiana</i> Willd	21
2.2.1 Taxonomia: Classificação e nomenclatura	21
2.2.2 Família Salicaceae	21
2.2.3 Gênero Salix	22
2.2.4 Aspectos gerais e distribuição da espécie <i>Salix humboldtiana</i>	23
2.2.5 Biologia do <i>Salix humboldtiana</i>	25
2.3.6 Constituintes química e utilização farmacológica do grupo <i>Salix</i>	28
2.4 ZEBRAFISH: MODELO PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA (ANTI-INFLAMATÓRIA)	32
2.4.1 <i>Danio rerio</i> (Zebrafish)	32
2.4.2 Processo patológico da inflamação e avaliação da atividade anti-inflamatória <i>in vivo</i> (Modelo zebrafish)	34
3 OBJETIVOS	37
3.1 GERAL	37
3.2 ESPECÍFICOS	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 MATERIAIS	38
4.1.1 Matéria prima vegetal	38
4.1.2 Modelo animal zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	39
4.1.3 Equipamentos	39
4.1.4 Material de consumo	40
4.1.4.1 Solventes, reagentes, reveladores e soluções padrões	40

4.2 MÉTODOS.....	40
4.2.1 Processamento do material vegetal.....	40
4.2.2 Análises farmacognósticas da droga vegetal	41
4.2.2.1 Determinação da granulometria do pó do material vegetal	41
4.2.2.2 Determinação da perda por dessecação do material vegetal	42
4.2.2.3 Determinação da densidade bruta do material vegetal	42
4.2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais do material vegetal	43
4.2.2.5 Determinação do pH do material vegetal	44
4.2.2.6 Determinação do índice afrosimétrico ou de espuma	44
4.2.3 Estudos fitoquímicos	45
4.2.3.1 Preparação da tintura do <i>Salix humboldtiana</i>	45
4.2.3.2 Obtenção do extrato seco do <i>Salix humboldtiana</i> (EBSH)	46
4.2.3.3 Prospecção Fitoquímica	46
4.2.3.4 Fracionamento do EBSH	48
4.2.3.5 Cromatografia em camada delgada (CCD)	49
4.2.3.6 CCD-preparativa da fração FASH	50
4.2.4 Análises por CLAE-DAD	51
4.2.4.1 Preparação das amostras	51
4.2.4.2 Condições do método por CLAE-DAD	51
4.2.4.3 Instrumentação do método	51
4.2.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EBSH em modelo zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	52
4.2.5.1 Animais em estudo	52
4.2.5.2 Bioensaios em zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	52
4.2.5.3 <i>Danio rerio</i> : Características e vantagens como modelo animal	52
4.2.5.4 Obtenção dos peixes	53
4.2.5.5 Instalação, manutenção e acondicionamento dos animais	53
4.2.5.6 Grupos de tratamento	56
4.2.5.7 Vias de administração (gavagem e injeção intraperitoneal)	57
4.2.5.8 Indução da inflamação e mensuração do edema	59
4.2.5.9 Análise dos parâmetros comportamentais de zebrafish	60
4.2.5.10 Monitoramento da mortalidade e Eutanásia	62

4.2.6 Análise estatística	62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL.....	63
5.2 RENDIMENTO DO EBSH	65
5.3 ANÁLISE FARMACOGNÓSTICA	66
5.3.1 Determinação da Granulometria	67
5.3.2 Determinação da perda por dessecação do material vegetal	68
5.3.3 Determinação da densidade bruta	69
5.3.4 Determinação do teor de cinzas totais do material vegetal	69
5.3.5 Determinação do pH do material vegetal	70
5.3.6 Determinação do índice afrosimétrico (espuma)	71
5.4 RENDIMENTO	72
5.5 OBTENÇÃO DO EBSH	73
5.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EBSH E FRAÇÕES	73
5.7 FRACIONAMENTO DO EBSH	76
5.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)	78
5.9 ANÁLISE NO CLAE-DAD DO EBSH E FRAÇÕES	80
5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EBSH EM MODELO ZEBRAFISH (<i>Danio rerio</i>)	86
5.10.1 Animais utilizados no bioensaio	86
5.10.2 Bioensaio em zebrafish (<i>Danio rerio</i>)	86
5.10.3 Grupos de tratamento	86
5.10.4 Vias de administração (gavagem e injeção intraperitoneal)	87
5.10.5 Indução da inflamação, mensuração do edema e efeito do EBSH em modelo zebrafish	88
5.10.6 Avaliação dos parâmetros comportamentais de zebrafish após exposição às substâncias testes (EBSH)	90
5.10.7 Monitoramento da mortalidade e Eutanásia	95
6 CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS.....	97
ANEXO.....	116

1 INTRODUÇÃO

O uso das plantas medicinais no tratamento de enfermidades é muito antigo e está intimamente relacionado com a própria existência e evolução da espécie humana, fazendo parte desde o início da sua história. Tendo grande importância tanto no que se refere aos aspectos medicinais, como culturais. Logo, a utilização das plantas medicinais, por antepassados, embasava-se em suas próprias experiências empíricas de acerto ou erro, da observação do uso de plantas pelos animais, além de crenças e intervenção divina (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010; BARNES et al.; ANDERSON; PHILLIPSON, 2007; PINTO et al., 2002).

De acordo com a RDC nº 26/2014 e a RDC nº 463/2021, planta medicinal "É a espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos e/ou profiláticos". Os governos de vários países, vêm por meio de Políticas, programas e resoluções, para expressar sua posição a respeito da necessidade de valorizar a sua utilização. Ao observar que até 90% das populações em países em desenvolvimento, dependem delas como a principal fonte de cuidados à saúde e em muitas vezes a única (PINTO et al., 2002; RODRIGUES; DE SIMONI, 2010).

À vista disso, do crescimento exponencial nas últimas décadas do mercado mundial de fitoterápicos são alicerçados: crescente custos da saúde, aumento doenças crônicas não transmissíveis, envelhecimento da população, valorização de hábitos mais saudáveis, descoberta de novos princípios ativos de plantas, comprovação científica da eficácia e preço mais acessível. Seguindo esse contexto, são necessários maiores investimentos em pesquisa e desenvolvimento de fármacos naturais. Logo, o estudo de espécies nativas, com potencial farmacológico, se mostra extremamente estratégico (WHO, 2013; EMBRAPA, 2008).

No Brasil, conhecida popularmente como salgueiro, a espécie *Salix humboldtiana* é uma planta da família Salicaceae, nativa da América. Apresenta folhas e cascas amplamente empregadas no tratamento de inflamações, reumatismo (CARPANEZZI; TAVARES; SOUZA, 1999; GHAREMANINEJAD et al., 2012).

As propriedades farmacológicas dos constituintes químicos do *S. humboldtiana* e sua utilização na fitoterapia popular revelam seu potencial para o desenvolvimento de novas opções terapêuticas que possam ser utilizadas no tratamento de diversas doenças de natureza inflamatória crônica e aguda (FERNANDES et al., 2009).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 USO DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERAPIA NO BRASIL

2.1.1 Perspectiva histórica no uso das plantas medicinais e fitoterapia

A utilização das plantas medicinais remonta, desde os primórdios da civilização humana. Utilizando as mesmas por meio da retirada direta das espécies do ambiente natural. É fato, que os povos da antiguidade, deixaram indícios do uso das plantas, nas mais diversas formas, para as mais diversas causas e males (RODRIGUES; DE SIMONI, 2010; BARNES; ANDERSON; PHILLIPSON, 2001).

Contudo, assim que a espécie humana passou a existir e a ocupar as diferentes regiões do planeta, abrindo a compreensão da sua existência e de seu significado. Dois elementos passaram a fazer parte do seu cotidiano: o perigo e a sobrevivência. Tudo que os nossos antepassados faziam era escapar dos perigos e buscar a sobrevivência (CARIBE; CAMPOS, 1991; FERNANDES; ROCHA, 1997).

Não obstante, no ambiente natural, onde eles habitavam, o perigo era retratado, pelos animais selvagens, além de diversos outros inimigos, alguns invisíveis, vírus e bactérias, fonte das infecções, inclusive outros males e enfermidades. Logo, a primeira forma de combater e sobreviver a esses “inimigos” foi a utilização dos recursos da própria natureza, o único existente, a exemplo: plantas, animais e minerais (BADKE et al., 2012; ALVES, 2013; BRODY, 2000).

À vista, a sociedade humana, por meio da cultura popular, resultado do acúmulo de informações e experiências sobre o ambiente que os cercam, para com ele interagir, conseguiu transmitir seus costumes e conhecimento empírico de geração em geração ao longo dos tempos. Exemplo disso, que nos primórdios, o cuidado à saúde era desenvolvido por mulheres, cujo conhecimento era adquirido no seio familiar e a utilização das plantas representou o principal recurso terapêutico para tratar a saúde de suas famílias (BADKE et al., 2012; PINTO et al., 2002).

Desse modo, o uso das plantas medicinais se confunde até mesmo com a própria história da humanidade, fazendo inclusive parte da nossa evolução, e se estende até os dias atuais. Em outras palavras, da antiguidade até os dias atuais, o uso das plantas medicinais persiste (LORENZI, 2008; REVILLA, 2001, BRODY, 2000).

Assim, é inerente afirmar que as plantas medicinais foram sem dúvida alguma: o primeiro médico, o primeiro hospital, a primeira farmácia, as primeiras curas, prevenções e tratamentos. Portanto, elas continuam mantendo seu papel primordial para a humanidade. Servindo de base para pesquisas e desenvolvimento de novos medicamentos nas mais diversas enfermidades (VEIGA JUNIOR et al., 2005).

2.1.2 Regulamentação e normatização: Controle de qualidade e padronização das plantas medicinais e da fitoterapia no Brasil

O Brasil é considerado um dos países de maior biodiversidade do planeta por possuir cerca de 22% do número total de espécies de plantas do mundo. Está imensa biodiversidade representa o maior patrimônio nacional. O número de espécies pode ser estimado em até 550.000 (SIMÕES et al., 2010; CORRÊA, 1998; FEIJÓ, 2013).

No Brasil, o uso das plantas medicinais tem sido paulatinamente incorporado aos serviços públicos de saúde. A regulamentação, normatização e a institucionalização de prática em saúde, originadas nas medicinas tradicionais tiveram início a partir da década de 1980, principalmente após a criação do Sistema Único de Saúde (SUS), que afirma que saúde é um direito de todos e dever do Estado (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Duas décadas depois, foi criada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, instituída pela Portaria do Ministério da Saúde nº 971, de 2006, tendo como objetivo ampliar as opções terapêuticas para os usuários do SUS, dentre estas, a fitoterapia, com garantia de acesso a fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, eficácia e qualidade, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Agregando-se ao Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006), que visa “garantir à população brasileira o acesso seguro e racional de plantas medicinais e fitoterápicos” em 2009. Ademais, o Ministério da Saúde elaborou e divulgou a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), na qual estão presentes 71 espécies vegetais usadas pela sabedoria popular e devem ser investigadas prioritariamente (Quadro 01), dentre elas a *Salix alba* popularmente conhecida como salgueiro branco (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b).

Quadro 01 - Lista de plantas medicinais utilizadas no senso comum.

NOME CIENTÍFICO POPULAR	PARTE UTILIZADA	FORMA DE UTILIZAÇÃO/ VIA	INDICAÇÃO/USO
<i>Aloe vera</i> (Babosa)	Folhas	Emplastro (Tópica)	Cicatrizante
<i>Rhamnus purshiana</i> (Cáscara sagrada)	Folhas	Infusão (Oral)	Constipação intestinal
<i>Maytenus ilicifolia</i> (Espinheira-santa)	Folhas	Infusão (Oral)	Dispepsias, gastrite e úlceras
<i>Salix alba</i> (Salgueiro Branco)	Casca e Folhas	Infusão (Oral)	Anti-inflamatório, analgésica e antitérmica

Em termos de fitoterapia, depois da criação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o Brasil teve a RDC nº 17/2000 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos, que foi revogada pela RDC nº 48/2004 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e que, por sua vez, veio a ser revogado pela RDC nº 14/2010, todas referentes ao registro de medicamentos fitoterápicos, seja por meio de estudos não clínicos e clínicos, por dados de literatura, por tradicionalismo, ou por registro simplificado (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2010b, BRASIL, 2019a).

Atualmente, a RDC nº 26/2014, que revogou a RDC nº 14/2010, separa os fitoterápicos em duas classes: Medicamentos Fitoterápicos e Produtos Tradicionais Fitoterápicos - PTF, estabelecendo normas para o registro de fitoterápicos, enfatizando a necessidade de estudos químicos, físico-químicos, toxicológicos, clínicos, e o certificado de boas práticas de fabricação e controle de qualidade para o local de produção (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2014; CARVALHO, 2006).

Portanto, esse conjunto de políticas, resoluções e portarias implementado pela ANVISA/Ministério da Saúde, vem no sentido de normatizar e regulamentar o uso de plantas medicinais e seus derivados, visando principalmente garantir à população o acesso às plantas medicinais e fitoterápicos, com segurança, eficácia e qualidade (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2014; BRASIL, 2019a).

2.2 CARACTERIZAÇÃO BOTÂNICA DO *Salix humboldtiana*

2.2.1 Taxonomia: Classificação e nomenclatura botânica

A busca pela nomenclatura e sinônimos foi realizada nas bases de dados: Flora do Brasil; Trópicos (2019); *International Plant Names Index* (IPNI) e JOLY (1998).

Descritos:

- Classe: Magnoliopsida
- Subclasse: Magnoliidae Novák
- Superordem: Rosanae Takht
- Ordem: Malpighiales
- Família: Salicaceae
- Gênero: *Salix*
- Espécie: *Salix humboldtiana* Willd

2.2.2 Família Salicaceae

A Salicaceae corresponde a uma família bastante numerosa e heterogênea, constituída por aproximadamente 50 gêneros e mais de 1000 espécies, espalhadas pelo mundo. Aqui no Brasil ocorrem 19 gêneros e cerca de 80 espécies. Tal peculiaridade remete a uma difícil tarefa na identificação e catalogação (FERNANDES et al., 2009). Sendo assim considerada uma família de distribuição cosmopolita, devido seus representantes disporem de aptidão para habitarem praticamente todos os continentes, em diversos biomas do planeta (Figura 01) (SOUZA; LORENZI, 2005; MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2015; JOLY, 1998).

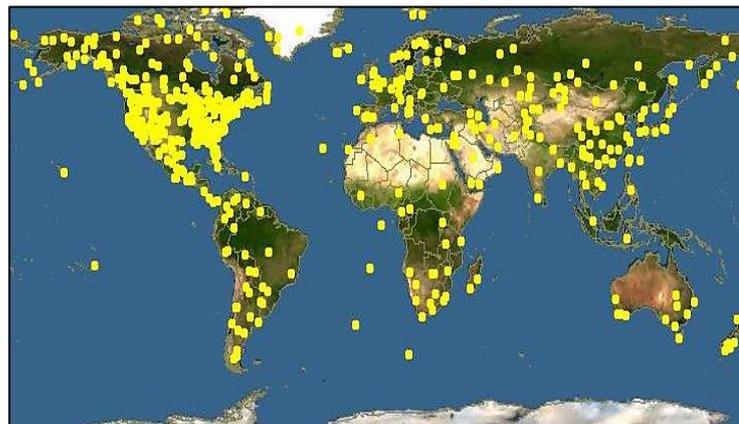


Figura 1. Distribuição geográfica da família Salicaceae. Fonte: Trópicos, 2019.

Devido às características fitoquímicas, a família Salicaceae passou a exercer uma importante função medicinal, relacionada sobretudo à atividade terapêutica de seus metabólitos secundários. Algumas espécies passaram a ser utilizadas de forma rotineira e sistemática, exercendo destaque na literatura científica, como por exemplo, *Salix alba*, na qual foi isolado pela primeira vez a salicilina, em 1829 pelo farmacêutico francês Henri Leroux. Utilizado, posteriormente, na indústria farmacêutica para desenvolver o ácido acetilsalicílico (AAS) que apresentava ação anti-inflamatória (QIN e SUN, 2005; NAHRSTEDT et al., 2007; TECHIO; BELO, 2012).

Muitos outros avanços se deram com o passar dos anos, principalmente nas pesquisas voltadas para a fitoquímica da família Salicaceae. Elas foram conhecidas, como produtoras de uma ampla gama de compostos químicos. Apresentando em sua química molecular, essencialmente heterosídeos fenólicos (MOSADDIK et al., 2004).

Os salicilatos, que são glicosídeos fenólicos endógenos, é o grupo químico mais conhecido desta família, tendo como exemplo: a salicina, salicortina, salicilol e o ácido salicílico. Esta classe de compostos exerce, particularmente, efeitos anti-inflamatórios por conta da inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) levando à inibição da síntese de prostaglandinas (YU et al., 2002).

2.2.3 Gênero *Salix*

Existem cerca de 400 espécies de árvores e arbustos do gênero *Salix*, além de diferentes variedades e híbridos, distribuídos em diversas latitudes da Europa, Ásia, América, África e Oceania, com exceção da Antártida. Na sua quase totalidade, naturais de regiões de clima temperado e ambientes úmidos (ARGUS, 2007).



Figura 2. Distribuição geográfica do gênero *Salix*. Fonte: Discoverlife, 2019.

Na América do Sul, existe apenas uma espécie nativa, *Salix humboldtiana*, que ocorre naturalmente desde o norte do México (23° N) até a província de Chubut, na Argentina (45° S) (MOURA, 2002; FREISCHMIDT et al., 2012).

Tradicionalmente, a classificação botânica ocorre baseada em características morfológicas. Porém novas técnicas foram desenvolvidas, como exemplo: genética e a biologia molecular. Dessa forma, fornece melhores evidências para a classificação. Algumas espécies que estavam em outros grupos foram incorporadas ao gênero *Salix*. Atualmente os representantes desse gênero estão divididos em cinco subgêneros: *Salix*, *Protitea*, *Longifoliae*, *Chamaetia* e *Vetrix*, e cada subgênero, consiste em várias seções, no qual compartilham muitas características em comuns (ISEBRANDS; RICHARDSON, 2014; MAZINE; SOUZA; RODRIGUES, 2002).

De todos os cinco subgêneros existentes, o de maior relevância e volume, corresponde ao do *Salix*, onde se encontra a espécie *Salix humboldtiana*. Uma das características mais importantes desse subgênero está em sua utilização na medicina popular, onde suas folhas e cascas são empregadas para o tratamento da febre (FREI et al., 2009; DEHARO et al., 2001); malária (BOURDY, CHÁVEZ-DE-MICHEL e ROCA-COULTHARD, 2004), reumatismo (GAUTAM, SAKLANI e JACHAK, 2007) e constipação (SCARPA, 2004; MONIGATTI, BUSSMANN e WECKERLE, 2013).

Tais efeitos farmacológicos, sobretudo a atividade anti-inflamatória, são resultantes de compostos com ações inibitórias em caminhos bioquímicos do ácido araquidônico (WURM; BAUMANN; GERE, 1982; SHARMA et al., 2011), a ação enzimática da hialuronidase (KUPPUSAMY; KHOO; DAS, 2009) e a produção de radicais de oxigênio (ROHNERT; SCHNEIDER; ELSTNER, 1998), sendo um efeito global baseado nos efeitos aditivos de flavonoides, taninos, derivados de álcool salicílico e outros compostos ainda desconhecidos (WILLIAMSON, 2001).

2.2.4 Aspectos gerais e distribuição da espécie *Salix humboldtiana*

A origem do nome *Salix*, acredita-se ter sido dada pelos romanos, 400 a.c, ao caracterizar o salgueiro, o termo significa “próximo da água”, uma alusão ao habitat de preferência do gênero, visto que são encontradas às margens de rios. Já o termo *humboldtiana* é homenagem ao naturalista alemão Friedrich Humboldt, conhecido como Barão de Humboldt (1769-1859). Dessa forma, sendo descrita a taxonomia para nomenclatura botânica da espécie (ROMARIZ, 1996; FILHO, 2009; LORENZI, 2002).

Usualmente, nos diferentes estados brasileiros, é denominado de salseiro, salgueiro, salso, salgueiro-do-rio e salgueiro-chorão, enquanto que em países de língua espanhola recebe os nomes de *sauce* e *sauce criollo* e nos de língua inglesa, *pencil willow* e *creole willow* (CARPANEZZI; TAVARES; SOUZA, 1999).

O *S. humboldtiana* é uma espécie que se encontra distribuída nas mais variadas zonas climáticas do planeta, desde áreas temperadas e frias, bem como as tropicais e subtropicais. Sendo nativa do continente Americano (Figura 03), situa-se em quase toda sua extensão territorial, em especial na costa oeste em direção à faixa litorânea do oceano pacífico. Estende-se do norte do México ao sul da Argentina. Abrange uma parte da América do Norte, todo o conjunto da América Central e Caribe além da América do Sul, de onde é originária (LORENZI, 2002; CARPANEZZI; TAVARES; SOUZA, 1999; ROMARIZ, 1996; GHAREMANINEJAD, 2012).

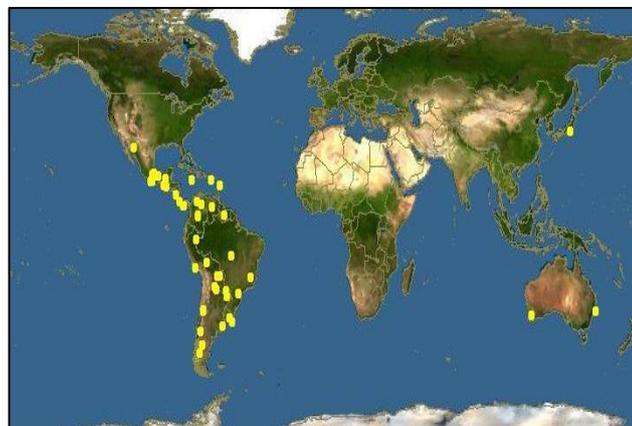


Figura 3. Distribuição geográfica da espécie *Salix humboldtiana*.
Fonte: Discoverlife, 2019.

No Brasil, a biogeografia da espécie se evidencia pela sua presença na Região Norte (Amazonas e Pará); Região Centro-Oeste (Mato Grosso e Mato Grosso do Sul); expandindo-se por toda Região Sul do Brasil, onde são mais frequentes, especialmente nas bacias dos rios Paraná e Uruguai, inclusive no delta do Rio Prata. Fato esse, devido ser uma espécie habituada em solos úmidos. Nesse cenário o destaque vai para o Rio Grande do Sul, em virtude de apresentar maior volume da espécie (REITZ; KLEIN; REIS, 1983; ROMARIZ, 1996).

Dentre suas principais aplicações e utilização estão: o cultivo para ornamentação e paisagismo de parques e casas; no reflorestamento de áreas degradadas. Sua madeira possui importante uso em serraria, caixotaria, em obras e construções. Recentemente através da biotecnologia, a espécie tem se mostrado

adequado na fitorremediação de áreas contaminadas por metais, devido a sua capacidade de acumular em seus tecidos, altos níveis de metais pesados, exemplo o cádmio (GOMES et al., 2011; AMADO; CHAVES-FILHO, 2015; REGIS et al., 2005).

No panorama da saúde, a espécie apresenta-se como tendo um importante uso na medicina popular, a exemplo de outras espécies do gênero. Suas folhas e cascas são empregadas em infusões e tinturas, para o tratamento de alterações inflamatórias, febre, cefaleia e até mesmo em reumatismo. Tudo isso, em razão de possuir salicilatos endógenos, com propriedades anti-inflamatórias (ROMARIZ, 1996; CARPANEZZI; TAVARES; SOUZA, 1999; SHARMA et al., 2011).

2.2.5 Biologia do *Salix humboldtiana*

O *S. humboldtiana* possui em sua biologia, aspectos relevantes, para o estudo em diferentes áreas do conhecimento, por exemplo: fitoquímica, ciências ambientais, etnobotânica, etc. Concatenam-se aqui as características inerentes da espécie: morfologia, fisiologia e suas interações entre planta/ambiente e planta/sociedade. (SALES; SARTOR; GENTILLI, 2015; ROMARIZ, 1996; SANTOS et al., 2008).

A espécie é considerada uma planta do tipo pioneira, com identificação nos diferentes domínios fitogeográficos do ecossistema brasileiro. Representado pela Amazônia, Mata Atlântica, sobretudo os campos dos Pampas Gaúchos. Essa relação, entre espécie e seus domínios naturais, resulta do seu comportamento higrófito, expresso pela adaptação a terrenos úmidos, típica de formações em matas ciliares, regiões de beiras de rios, córregos e lagos (Figura 04: A e B). Dessa forma, apresenta ampla tolerância às variações ambientais, devido sua grande valência ecológica, sendo essa uma aptidão necessária para sobrevivência (ROMARIZ, 1996; LORENZI, 2002; TAVARES e SOUZA, 2005; MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2015).

Por se tratar de uma espécie caducifólia, ou seja, planta que anualmente perde suas folhas de maneira sazonal, nos meses mais frios e sem chuva (outono e inverno). Outra singularidade à sua floração que ocorre de setembro a novembro; sua frutificação de fevereiro a abril; sua polinização do tipo entomófila, principalmente por pequenos insetos. Além das dispersões das sementes que são feitas por agentes: ornitocórica, hidrocórica. Todos esses aspectos, são elementos importantes para a compreensão da biologia da espécie (CARPANEZZI; TAVARES; SOUZA, 2005).



Figura 4. Hábitat natural: Margens de rios **(A)** e lagos **(B)**.
 Fonte: FRANKO e TELOKEN, 2011. Fotografo: Wagner Silveira, 2009.

Morfologicamente, a espécie é do tipo arbóreo, sua altura de porte médio, podendo atingir até 20 m, apresenta tronco lenhoso, levemente inclinado, com até 90 cm de diâmetro, coberto por uma casca grossa, de cor cinza escuro, com fendas longitudinais profundas que são unidas obliquamente (Figura 5-A). Possuem ramos finos e pendentes, com ampla copa aberta de ramificação ascendente (Figura 5-B). Suas folhas são longas, cerca de 15 cm de comprimento X 1,5 cm de largura, com disposição simples e alternas (Figura 6-A e 6-B). O formato do limbo é linear-lanceolada, com o mesmo tom de verde em ambos os lados, suas bordas serradas finamente e seu pecíolo reduzido, seu ápice é acuminado e nervura peninérvea biconvexa. Suas raízes são grandes e fibrosas (CARPANEZZI; TAVARES; SALES; SARTOR; ROMARIZ, 1996; SANTOS et al., 2008).

Completando, temos as flores, com a função nectarífera, apresentando inflorescência do tipo amentilho, sem pétalas (Figura 7A). São plantas dioicas, com flores diclinas, unissexuais, cada sexo distribuído em indivíduos separados, sendo as masculinas amarelas e as fêmeas esverdeadas. Ou seja, sua reprodução é sexual (alógamas), pois realizam polinização cruzada, quando o pólen de uma planta fertiliza o óvulo da flor de outra planta. Gerando heterozigose e variabilidade genética, garantindo assim sua adaptabilidade (ROMARIZ, 1996; SANTOS et al., 2008).

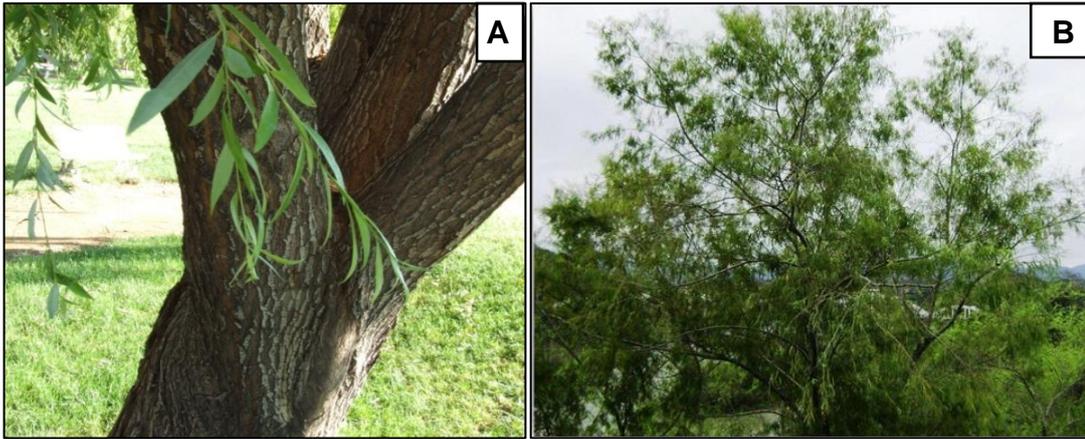


Figura 5. Morfologia Vegetal: Tronco com casca grossa de cor cinza com fendas longitudinais **(A)**; Copa ampla e com ramificações ascendentes **(B)**. Fonte: Foto por: J. González, 2013.

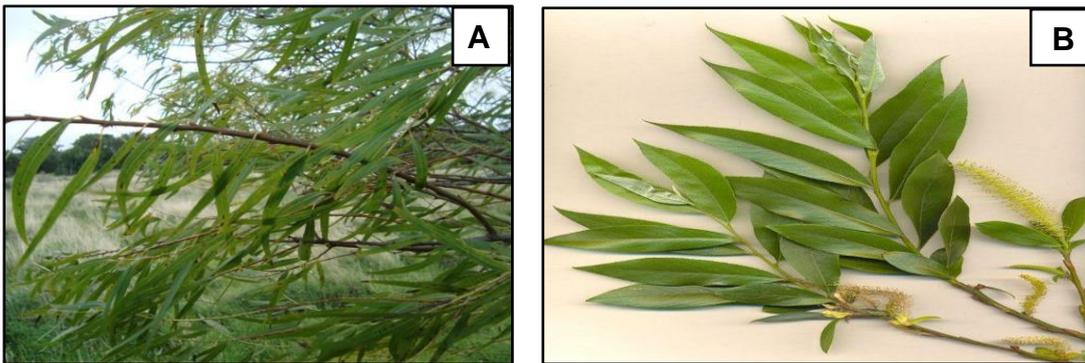


Figura 6. Morfologia das Folhas: Disposição simples e alternas **(A)**; Ramos das Folhas **(B)**. Fonte: Luciano Rodrigues Soares (Fotografo) RS, Sobral et al., 2006.

Por fim, dentre outras idiossincrasias da descrição morfológica, temos o fruto, em formato de cápsulas de 0,5 cm de comprimento, com coloração castanho-claro (Figura 7-B), contendo em seu interior dezenas de semente leves, de tamanho diminuto, sendo microscópicas (1 mm), com coloração escura (SALES; SARTOR; ROMARIZ, 1996; SANTOS et al., 2008; GHAREMANINEJAD et al., 2012).

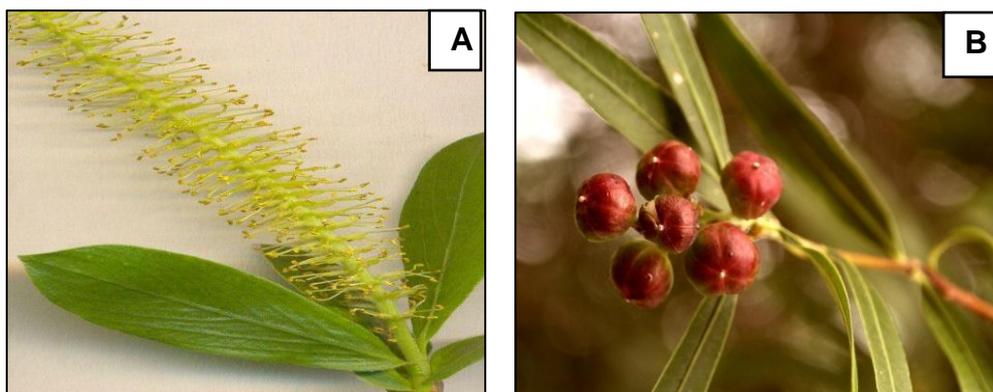


Figura 7. Particularidades botânicas: Inflorescência do tipo amentilho sem pétalas **(A)**; Fruto em formato de cápsula **(B)**. Fonte: Laboratório de Manejo florestal, 2018 **(A)**; Trópicos, 2018 **(B)**.

2.2.6 Constituição química e utilização farmacológica do gênero *Salix*

Há tempos o gênero *Salix* são conhecidos pelas suas propriedades e importância terapêutica, sobretudo em virtude das suas características (analgésicas e anti-inflamatórias) e constituição química, atribuídas às substâncias ativas, à exemplo: a salicina (VIEGAS; BOLZANI; BARREIRO, 2006; YU et al., 2002). Em razão dessa importância medicinal, algumas espécies se consagraram na literatura, como é o caso do *Salix alba*, suas cascas e folhas, contém compostos salicilatos, sendo utilizada no tratamento de inúmeras patologias, sinais e sintomas (MAHDI; BOWEN, 2006).

Esse conjunto de salicilatos presentes no gênero *Salix*, dispõem de um portfólio variado, devido a existência de uma gama de flavonoides que os constituem, suas atividades biológicas e mecanismo de ação, são principalmente através da ação anti-inflamatória, explicada pela inibição de células pró-inflamatórias e regulação das enzimas fosfolipases A₂, lipooxigenasas. A quercetina, miricetina e a luteolina são exemplos desses flavonoides (ZHANG et al., 2007; SIMÕES et al., 2010).

Vários estudos têm demonstrado a eficácia dos extratos padronizados da casca do *Salix alba* no tratamento de mialgias, artrite, artrose e condições inflamatórias crônicas e agudas (MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2015; SHARMA et al., 2011).

Dessa forma, a seleção etnofarmacológica de plantas para a pesquisa e desenvolvimento, baseada na alegação terapêutica apresentada por seres humanos, relativo a um determinado efeito, pode ser uma valiosa pista para a descoberta de novos fármacos. Nesse cenário, o uso tradicional pode ser visto, como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica e uso medicinal (ELISABETSKY, 2003).

Os compostos fenólicos são a maior categoria de fitoquímicos e os mais amplamente distribuídos na natureza, com grande heterogeneidade e uma imensa quantidade de variedades e tipos, estruturas, funções e classificações (MATSUKI, 1996). Existindo mais de 8 mil substâncias diferentes desse grupo, que já foram identificadas, englobando desde moléculas simples até moléculas com alto grau de complexidade e polimerização (ELISABETSKY, 1999; ANGELO & JORGE, 2007).

Devido ao seu alto grau de diversidade e multiplicidade, os compostos fenólicos apresentam inúmeras funções. Nos alimentos são responsáveis pelo sabor, adstringência, aroma, estabilidade oxidativa, além de contribuir para coloração através dos pigmentos (SIMÕES et al., 2010). Porém uma das principais funções está na defesa, contra estresse ocasionado por fatores ambientais e biológicos (ANGELO &

JORGE, 2007). Atuam na proteção contra a radiação UV; agem como agente antipatogênico, prevenindo e combatendo infecções causadas por fungos, vírus e bactérias, além de ataque de insetos (MATSUKI, 1996; DORNAS et al., 2007).

Sua origem biossintética, resulta do metabolismo secundário vegetal, sendo relacionado a três rotas biogênicas: a via do ácido chiquímico (carboidratos); a via do acetato-malonato (malonil-CoA e acetil-CoA) e a via mista (ácido chiquímico + acetato) (MELO et al., 2011; DORNAS et al., 2007; RAWEL et al., 2002).

A rota do ácido chiquímico é formada pela condensação de dois metabólitos da glicose, eritrose-4-fosfato e o fosfoenolpiruvato; a rota do acetato ocorre com a carboxilação do Acetil-CoA na presença (coenzimas); já a rota mista resulta na combinação do ácido chiquímico com acetato (DORNAS et al., 2007; RAWEL et al., 2002; PATHAK et al., 1991; LAKHANPAL; RAI, 2007; MATSUKI, 1996;).

Quimicamente, os componentes fenólicos são substâncias que possuem em sua estrutura, um ou mais, anel aromático, sendo o hidrogênio, substituído por grupamentos (Figura 08). Como regra, o grupo hidroxila é sempre inserido, como um dos substituintes, podendo haver também outros grupos funcionais (SOUSA et al., 2007; DORNAS et al., 2007).

Em geral, tendem a ser solúvel em água, em razão da presença de hidroxilas e também devido se apresentarem frequentemente na forma de glicosídeos, associados a açúcares ou polimerizados com proteínas, uma vez que, ambos aumentam a polaridade (SIMÕES et al., 2010; SILVA et al., 2010).

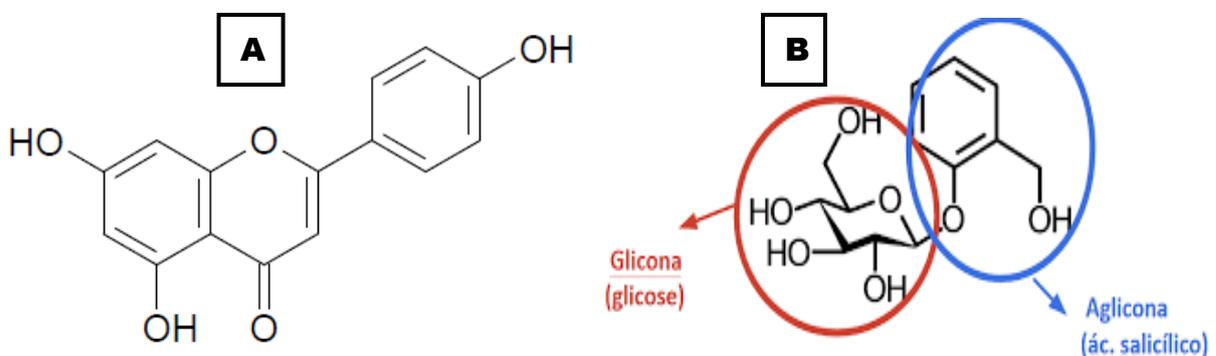


Figura 8. Estrutura básica dos compostos fenólicos; Estrutura básica dos glicosídeos. Fonte: Adaptado de BRUCE, 2007; MELO et al., 2011; IUPAC, acesso em: 15/04/2019.

Logo, a classificação dos compostos fenólicos, habitualmente encontrados nas espécies vegetais é determinada de acordo com a estrutura química, isto é, o arranjo espacial e grupos funcionais, em que as moléculas se apresentam (MANACH et al.,

2004). Dessa forma, temos o fenol em função do número de anéis, sendo os simples e os polifenóis e o fenol em função do tipo de substituições específica em relação aos grupamentos, sendo os de forma livre e os complexados com açúcares ou proteínas (DORNAS et al., 2007; PATHAK et al., 1991; SOUSA et al., 2007; MATSUKI, 1996).

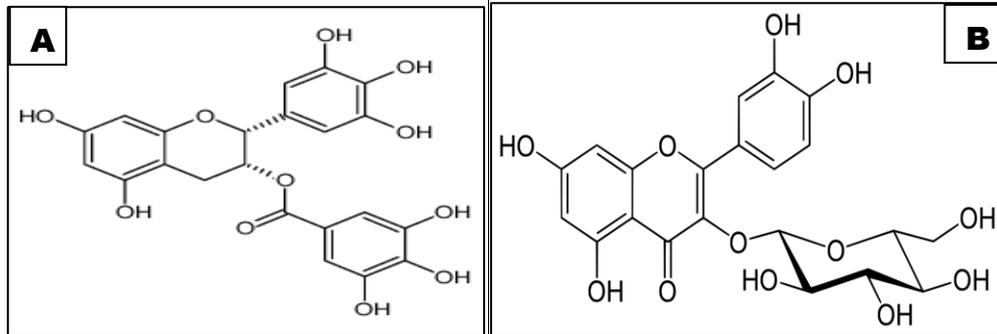


Figura 09. Estruturas moleculares: Polifenol (A); Isoquercetina (Polifenol glicosilado) (B). Fonte: BEECHE, 2003; BRUCE, 2007; IUPAC, acesso em: 15/04/2019 (Adaptados).

De maneira geral, os compostos fenólicos foram divididos em subclasse RIBÉREAU-GAYON, detalhada por Ribéreau-Gayon (1968). Que adotou três categorias: polímeros; pouco distribuídos na natureza e os largamente distribuídos (SOUSA et al., 2007; POHJAMO et al., 2003). No primeiro grupo, são os com alto peso molecular, na qual estão os taninos e as ligninas. O segundo grupo é escasso, pequeno número, exemplo: fenóis simples e ác. Benzóico. A última categoria corresponde aos compostos não-flavonoides (ác. Fenólico) e os flavonoides (polifenóis), essa variedade é demonstrada na (Figura 10) (MANACH et al., 2004; NAHRSTEDT et al., 2007; SILVA et al., 2010).

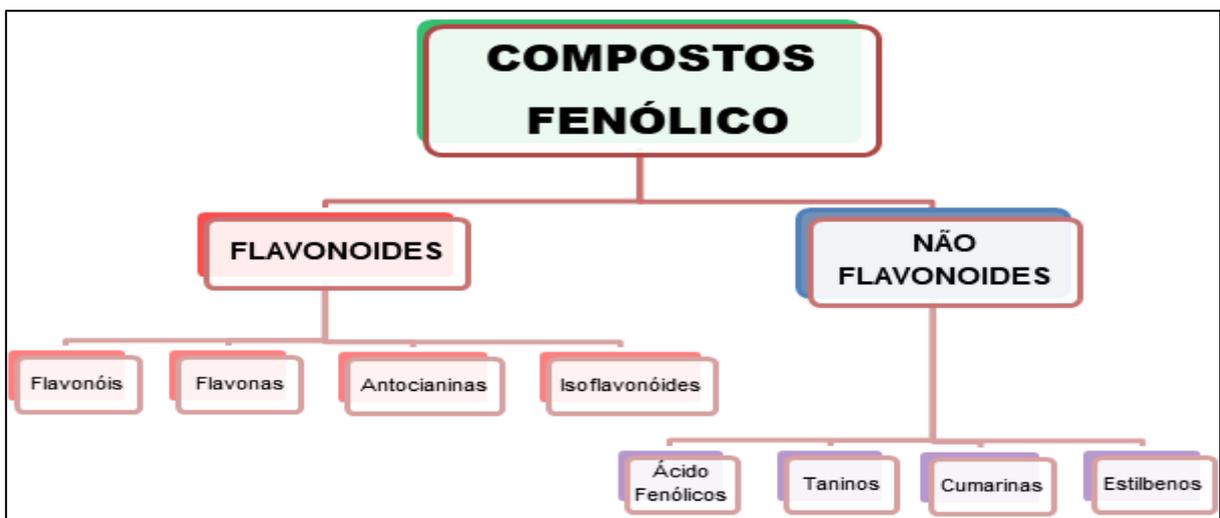


Figura 10. Classificação dos compostos fenólicos. Fonte: MANACH et al., 2004; SILVA et al., 2010 (adaptado).

As Monografias da OMS e do Ministério da Saúde, para espécie do gênero *Salix*, listam e evidenciam várias substâncias, com relevante importância medicinal, principalmente os derivados dos compostos fenólicos. Sobretudo, da classe dos flavonoides (flavonas, flavonóis, antocianinas) (QIN & SUN, 2005; NAHRSTEDT et al., 2007; CUNHA et al., 2005; POHJAMO et al., 2003).

De fato, espécies do gênero *Salix*, como é o caso do *S. humboldtiana*, são conhecidas pela produção de compostos fenólicos. Normalmente sob a forma de heterosídeos (POHJAMO et al., 2003). Que configuram os glicosídeos fenólicos endógenos, onde predominam os derivados do ácido salicílico ou salicilatos (CUNHA et al., 2005). Ainda existem: os salicosídeos, heterosídeos do álcool salicílico, salicilóis e tremulacinas (FERNANDES et al., 2009). Além de apresentar, dois importantes salicilatos, a salicortina e a salicina, entre outros derivados (ANGELO & JORGE, 2007; MANACH et al., 2004).

Os glicosídeos fenólicos contidos nesta família são conhecidos pelos seus efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e de redução da febre, e demonstraram aliviar os distúrbios reumáticos, infecções e cefaleias (KRAUZE; SZUMOWICZ, 2004; JAN et al., 2013; NAHRSTEDT et al., 2007; WHO, 1998; SHARMA et al., 2011).

Portanto, os salicilatos são os compostos mais relevantes do ponto de vista farmacológico, pertencentes ao gênero *Salix*. Esta classe de substâncias exercem ação principalmente na inflamação, por conta da inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2). Levando à inibição da síntese de prostaglandinas (MAHDI; MAHDI; BOWEN, 2006). Da mesma forma, produz efeitos nos distúrbios reumáticos: artrite, artrose e lombalgias (KRAUZE; SZUMOWICZ, 2004). E nas cefaleias (FERNANDES et al., 2009). Inclusive, flavonoides isolados do *Salix caprea*, exibem propriedades anti-infecciosas (POHJAMO et al., 2003; JAN et al., 2013; MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2015; SHARMA et al., 2011).

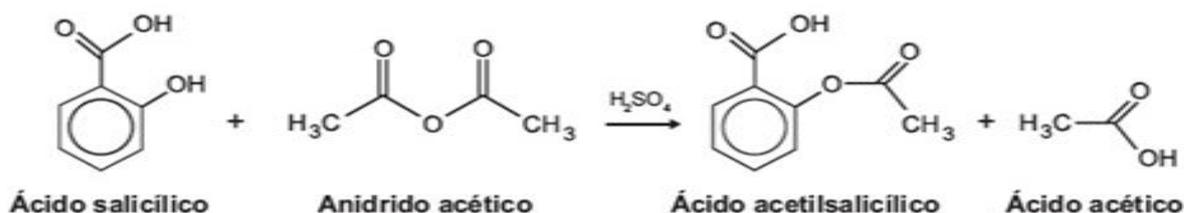


Figura 11. Estrutura química e equação química do ácido salicílico em ácido acetilsalicílico. Fonte: ANGELO; JORGE, 2007, adaptado.

2.4 ZEBRAFISH: MODELO PARA AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

2.4.1 *Danio rerio* (Zebrafish)

O *Danio rerio* (Hamilton, 1822), popularmente conhecido como: paulistinha, bandeirinha, peixe-zebra ou zebrafish é um pequeno peixe teleósteano que pertence ao gênero *Danio*, da família Cyprinidae (NELSON, 1994). Originário das planícies do sul da Ásia (Bacias hidrográficas do Rio Ganges): Índia, Bangladesh, Paquistão e Nepal. Esta região é caracterizada por clima de monções, com estações secas e chuvosas bem definidas, tal sazonalidade influencia diretamente o habitat do animal (Figura 12), tanto em termos de qualidade da água quanto na abundância de alimentos (STREISINGER, 1981; KNIE; SPENCE et al., 2008; LOPES, 2004).

Dessa forma, o zebrafish se caracteriza como uma espécie de regiões alagadiças, cujo o ambiente natural é representado por clima tropical, rios de água dulcícolas, claras, lânticas, pouca profundidade, presença de vegetação aquática submersa, lodo. Sendo encontrados principalmente nas plantações de arroz/arrozais (Figura 12) (ENGESZER et al., 2007; LAWRENCE, 2007; SPENCE et al., 2008).



Figura 12. Habitat natural do zebrafish. Fonte: Google imagens, acessado em: 05/04/2020.

Sua morfologia é caracterizada por apresentar um corpo fusiforme (esguio e alongado) com listras longitudinais (5 a 7) que se estendem ao longo do corpo, a partir do opérculo até nadadeira caudal, sendo essa a sua característica mais marcante e também seu padrão (listras claras e escuras) (Figura 13) (SCHNEIDER et al., 2009; LAWRENCE, 2007). Com boca projetada para cima, conforme pode ser observado na (Figura 13) (DAMMSKI et al., 2011). Quando adultos medem entre 3 cm a 5 cm e 1 cm de largura, podendo viver até 4 anos (GOLDSMITH, 2004; KNIE; LOPES, 2004).



Figura 13. *Danio rerio* (zebrafish). Fonte: Dowling, 2012.

O dimorfismo sexual desta espécie é facilmente visível na maturidade sexual, os machos são geralmente mais delgados e escuros, além disso, estes apresentam barbatana anal maior e tubérculos na nadadeira peitoral. As fêmeas são mais desenvolvidas e atingem a maturidade sexual antes dos machos. Elas tendem a ser maiores e com suas cores um pouco mais suaves. No corpo da fêmea, predomina o branco prateado e, no macho, o amarelo ouro (SPENCE et al., 2008; DAMMSKI et al., 2011; GOLDSMITH, 2004; LAWRENCE, 2007).

Com relação a reprodução e o desenvolvimento, o zebrafish possui alta taxa de reprodução, até 200 ovos por postura. Sua fecundação e desenvolvimento é externa, os embriões são grandes e apresentam claridade óptica integral. O desenvolvimento do animal é rápido, em 48 a 72 horas, evolui do estado de ovo para larva e se torna adulto aos 3 meses, onde atinge sua maturidade sexual (FISHMAN, 2001; DAMMSKI et al., 2011; SASZIK; SMITH, 2018).

Quanto ao comportamento, o *D. reio* é uma espécie gregária, devido serem animais sociais, comumente encontrados em cardumes de 5-20 indivíduos de sexos misturados, sendo animais pacíficos. Outra característica, está no fato que são muito ativos, sendo tipicamente diurno, mostrando os maiores níveis de atividade, durante as primeiras horas da manhã, também apresentam como hábito exclusivamente onívoros (LAWRENCE, 2007; DAMMSKI et al., 2011; KNIE; LOPES, 2004).

Desse modo, a utilização do zebrafish como modelo experimental, veio como alternativa promissora em relação aos modelos convencionais. Devido suas características e vantagens (alta versatilidade, baixo custo de manutenção, facilidade de manipulação, alta fecundidade, similaridade e homologia com a espécie humana). (STREISINGER, 1981; SPENCE et al., 2008; DAMMSKI et al., 2011; ESCALEIRA, 2017).

2.4.2 Processo patológico da inflamação e avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* (Modelo zebrafish)

A inflamação está presente em diversos processos patológicos, sendo essa uma síndrome que apresenta alterações imunológicas, bioquímicas e fisiológicas, produzidas e observadas no próprio local onde sofreu algum tipo de dano, lesão ou agressão está ocorrendo (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; MEDZHITOV, 2008; LAWRENCE; FONG, 2010; WANG et al., 2013).

Essas alterações são complexas e caracterizadas por elevação do fluxo sanguíneo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, migração celular (leucocitária), liberação de mediadores químicos pró-inflamatórios, ativação de mecanismos de fagocitose e quimiotaxia (Figura 14). Levando ao acúmulo de plasma e leucócitos nos tecidos extravasculares, isso se traduz em edema, dor, vermelhidão, calor e perda da função, sinais conhecidos como flogísticos (MEDZHITOV, 2008; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000; WANG et al., 2013).

Uma resposta inflamatória bem-sucedida, independentemente de sua natureza, possui três estágios fundamentais: Inflamação, proliferação e regeneração, podendo ser de natureza aguda ou crônica dependendo do tempo de duração (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; MEDZHITOV, 2008; LAWRENCE; FONG, 2010).

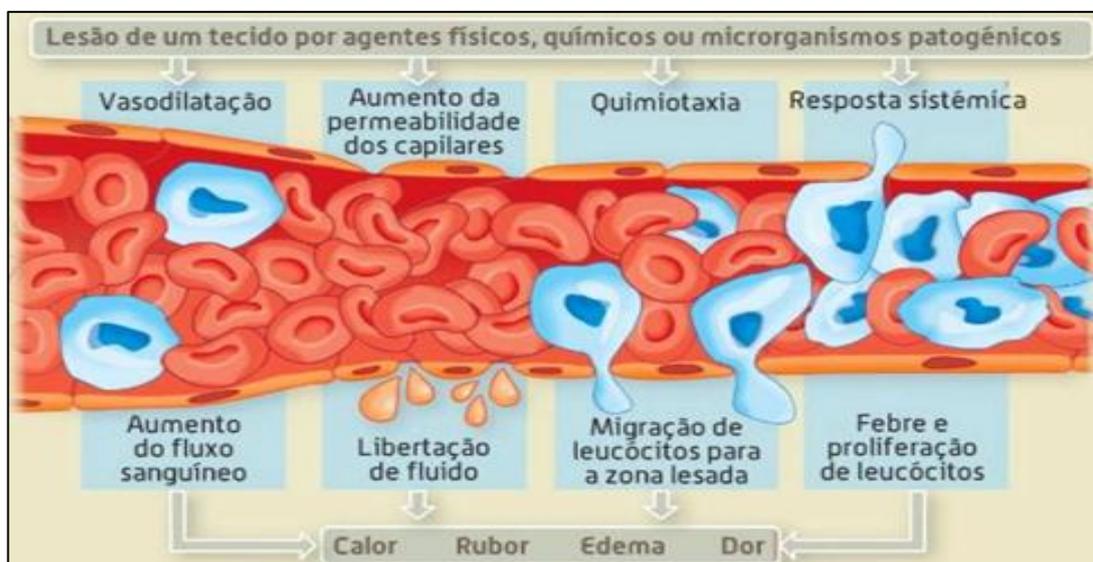


Figura 14. Mecanismo do processo inflamatório.

Fonte: <http://conhecetateimesmosaudepoisdos50.blogspot.com/2019/08/processo-inflamatorio.html>.

Ou seja, a inflamação é um mecanismo de defesa contra alguns estímulos nocivos ou agente agressor: parasitas, microrganismos invasores, agentes químicos ou físicos, necroses ou mesmo células danificadas. Essa resposta visa cessar a causa inicial da lesão celular e suas consequências. Logo, o processo inflamatório cessa quando os agentes agressores e os mediadores forem eliminados (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2013; RANG et al., 2007; MEDZHITOV, 2008; WANG et al., 2013).

No contexto de investigação do processo patológico da inflamação e da avaliação da atividade anti-inflamatória, existem vários métodos utilizados do ponto de vista laboratorial. Estes são bastantes variáveis e analisam alguns aspectos, dentro os quais podemos citar: fenômenos vasculares como desenvolvimento de edemas, eritemas, rubor, calor local, dor (Figura 15) (MEDZHITOV, 2008; LAWRENCE; FONG, 2010; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).



Figura 15. Sinais cardinais da inflamação. Fonte: MEDZHITOV, 2008 (adaptado).

Nas pesquisas científicas, o ideal para o estudo das doenças humanas seriam sempre os próprios seres humanos, porém raramente isso é possível. Quando não se pode investigar um problema no próprio ser humano, devido restrições éticas, limitações de tempo, espaço e custo, as ciências biomédicas, adotam outro caminho, caracterizado por um padrão de escala utilizando os modelos animais, para isso são levados em conta fatores como a semelhança evolutiva, anatômica, fisiológica, genéticas (COUTO, 2002; ESCALEIRA, 2017; DAMMSKI et al., 2011; FERREIRA; FERREIRA, 2003; SOUZA; MERUSSE, 1996).

A fim de buscar soluções viáveis para mitigar as dificuldades e limitações do uso de animais como modelo experimental. Os cientistas foram ensaiando algumas alternativas em relação ao modelo tradicional (roedores). Em 1955, foi relatado o primeiro ensaio utilizando o *Danio rerio* como modelo científico, porém somente no início da década 90, após as publicações do biólogo George Streisinger, esse peixe começou a ter projeção e impacto na pesquisa científica mundo afora (STREISINGER, 1981; SPENCE et al., 2008; DAMMSKI et al., 2011; GRUNWALD; EISEN, 2002).

No caso do modelo animal, o mais utilizado e também considerado o método clássico, para avaliação da atividade anti-inflamatória, corresponde ao “edema de pata” em roedores. Neles são administradas injeções de carragenina por via subcutânea na área subplantar da pata do animal, induzindo o aumento agudo e progressivo do volume local. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos fármacos (SOUZA; MERUSSE, 1996; LAPA et al., 2003; WINTER; RISLEY; NUSS, 1962; LIN, 2013).

Em contrapartida, no modelo zebrafish a mensuração corresponde ao edema peritoneal (abdominal) induzido por carragenina, no qual o modelo tem aplicabilidade nos ensaios da inflamação, em comparação ao método tradicional. Sendo que o zebrafish apresenta bastantes vantagens comparativas, entre elas: dose menor, facilidade de manuseio, custo reduzido, agilidade no processo, etc. (DAMMSKI et al., 2011; RESENDE; SOCCOL, 2015; MCGONNELL; FOWKES, 2006; LIN, 2013).

No edema peritoneal induzido por carragenina, os animais adultos são utilizados para testes de simulações de patologias humanas e triagem, especialmente de produtos naturais e medicamentos. Através de um modelo que se baseia na administração intraperitoneal de λ - carragenina, são descritos aumentos significantes do edema abdominal e proteínas pró-inflamatórias (TNF- α , iNOS) esses parâmetros são mensurados nos ensaios, fornecendo informações cruciais nas investigações e avaliação da atividade anti-inflamatória (HUANG et al., 2014; DAMMSKI et al., 2011; RESENDE; SOCCOL, 2015; SILVA, 2016; LIESCHKE; CURRIE, 2007).

Portanto, o zebrafish que anteriormente era criado apenas como ornamental, passou a ser utilizado em diversos estudos, desde células tronco, até alterações comportamentais induzidas por vício em drogas, além da própria avaliação da atividade anti-inflamatória e desenvolvimento de novas drogas. Devido às suas inúmeras características e vantagens (DAMMSKI et al., 2011; SHIN; FISHMAN, 2002; KNIE; LOPES, 2004; SASZIK; SMITH, 2018).

À vista disso, o *Danio rerio*, passou a ser considerado uma ferramenta promissora e ao mesmo tempo um caminho opcional para a análise e seleção de compostos candidatos a medicamentos, assim como os ensaios de processos biológicos e bioensaios (SILVEIRA; SCHNEIDER; HAMMES, 2012; PARNG et al., 2002; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003; BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Promover a atividade anti-inflamatória (anti-edematogênica) em modelo *Danio rerio* através do padrão de extrato hidroetílico e frações das folhas do *Salix humboldtiana*.

3.2 ESPECÍFICOS

- Determinar parâmetros farmacognósticos das folhas do *S. humboldtiana* através de testes físicos, químicos e físico-químicos;
- Determinar perfis cromatográficos do extrato e frações do *S. humboldtiana*, por CCD e CLAE-DAD;
- Realizar a atividade anti-inflamatória (anti-edematogênica) do extrato bruto hidroetílico do *S. humboldtiana* (EBSH) em modelo experimental *in vivo*, através dos ensaios de mensuração do edema induzido por solução de carragenina na região abdominal do zebrafish (*Danio rerio*);
- Descrever o comportamento animal diante das diferentes concentrações administradas do EBSH.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido nos laboratórios da Faculdade de Farmácia: Laboratório de Cromatografia Líquida e Espectrometria de Massas (LACREM) e o Laboratório de Fitoquímica (LAFQ) da Universidade Federal do Pará (UFPA), localizada no município de Belém, campus Guamá e no Laboratório da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP). No período de março de 2018 a agosto de 2020.

4.1 MATERIAIS

4.1.1 Matéria prima vegetal

As folhas de *Salix humboldtiana*, utilizadas nesta pesquisa, foram coletadas (fevereiro de 2018) no Rio Aquidauana, Anastácio, Mato Grosso do Sul, Brasil, em horário matutino. Sendo georreferenciado nas coordenadas: 20°28'42,55" de latitude sul (S) e 55°48'9,46" de longitude oeste (W). A identificação botânica foi realizada pelo Dr. Geraldo Damasceno (UFMS), apresentando as seguintes descrições: árvore de porte médio, com aproximadamente 20 m de altura, com tronco ramificado com fenda, as folhas longas cerca de 15 cm comprimento e 2,5 cm largura, com disposição simples e alternas, suas bordas serradas e ápice acuminado, sendo identificada em *Salix humboldtiana* Willd (Figura 16 - A e B). O material foi enviado seco, com 1,1 kg de peso. Transportado em saco plástico, dentro de caixa de papelão.

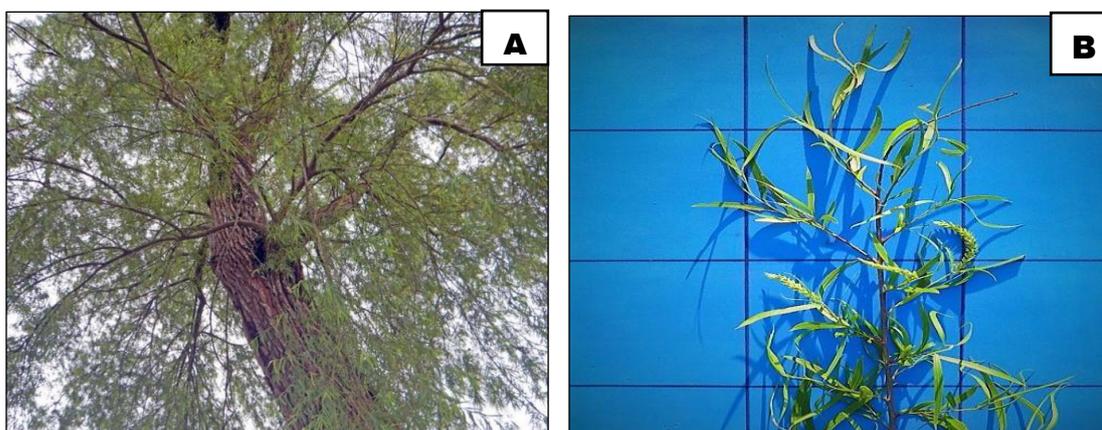


Figura 16. Folhas do *Salix humboldtiana*: Copa da árvore (A); exsicata (B). Fonte: FLORA BRASILIENSIS, 2019.

4.1.2 Modelo animal peixes zebrafish (*Danio rerio*)

Os peixes (*Danio rerio*), adultos com mais de 6 meses idade, de ambos os sexos, diferentes pesos (230 mg a 1000 mg) e tamanhos variados de 2 a 5 cm, utilizados nesta pesquisa. Foram adquiridos de Empresa certificada “Acqua New Aquários e Peixes LTDA-ME” (Comércio atacadista de animais vivo), situada no município de Igarassu/PE, inscrita no CNPJ (MF) sob o N° 40.829.624/0001-30. Apresentando registro junto ao IBAMA e protocolo de autorização de uso.

São animais extremamente resistentes e tolerantes, que se adaptam facilmente às condições adversas em seu ambiente, sendo um animal apto de ser mantido em criadouro. Possui suficiente robustez para ser manipulado de forma experimental; necessita de pouco espaço e também baixo custo de manutenção em biotérios, aproximadamente R\$ 0,60 centavos a unidade, sendo economicamente viável (DAMMSKI et al., 2011; HOWE et al., 2013; HILL et al., 2005).

Com relação aos aspectos reprodutivos e desenvolvimento, a espécie possui alta fecundidade até 200 embriões por postura, permitindo trabalhar com uma amostragem, estatisticamente representativa e com pouca variabilidade genética (KIMMEL et al., 1995; BARBAZUK et al., 2000).

A fertilização e desenvolvimento são extrauterinos, os embriões são grandes e completamente transparentes nos estágios embrionários, proporcionando uma excelente visualização óptica. O desenvolvimento é rápido, em 48 a 72 horas, evolui do estado de ovo para larva e se torna adulto aos 3 meses de vida, sendo o seu tempo de geração curto (STUELLEN et al., 2018).

4.1.3 Equipamentos

Os seguintes equipamentos foram utilizados durante o trabalho: Balança analítica (Shimadzu® AU220), Cromatógrafo a líquido de alta eficiência (CLAE): Modalidade analítica, equipado com Injetor automático, Marca Agilent Technologies, Modelo Infinity LC 1260, Detector de arranjos de diodos (DAD) - Agilent®; Espectrofotômetro UV (Shimadzu® UV-1800); Espectrofotômetro IV (Shimadzu® FTIR); Sistema de osmose reversa (QUIMIS® Modelo: Q842); Sistema Rotaevaporador (BUCHI® R-300) programável.

4.1.4 Material de consumo

4.1.4.1 Solventes, reagentes, reveladores e soluções padrões

Todos os solventes utilizados possuem grau de pureza P.A e HPLC, de marcas nacionais e importadas. Possuindo registro e autorização pelos órgãos regulamentadores e estão disponíveis no mercado, tais como: acetato de etila ($C_4H_8O_2$), acetona (C_3H_6O), acetonitrila grau HPLC (C_2H_3N), diclorometano (CH_2Cl_2), éter etílico (C_2H_5)₂^o, hexano (C_6H_{14}), metanol (CH_3OH), Tolueno (C_7H_8). Os reagentes e soluções foram preparados no laboratório de fitoquímica (UFPA). Reativo de Bouchardat, Reativo de Dragendorff, Reativo de Fehling (A e B), Reativo de Kedde, Reativo de Mayer, Reativo de Pascová, anidrido acético (CH_3CO)₂O, Lugol, solução aquosa de ninhidrina a 1%, entre outros.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Processamento do material vegetal

As folhas do *Salix humboldtiana* foram adequadamente processadas no laboratório de fitoquímica (UFPA). Inicialmente, foi efetuada a seleção através da separação manual dos galhos e realizada a segregação das folhas que apresentavam: contaminantes, deterioração, manchas, sinais de ataque por insetos ou fungos.

Em seguida, as mesmas foram lavadas em água corrente limpa para remover as sujidades e resíduos visíveis aderidos à superfície, depois dispostas em bancada sobre papel absorvente à temperatura ambiente para evaporação da água. Posteriormente foram higienizadas com álcool etílico a 70% para a retirada de possíveis contaminantes microbiológicos, promovendo a desinfecção.

Após esta etapa, as folhas foram pesadas e trituradas em moinho de facas até a sua pulverização, para a obtenção da droga vegetal, que foi devidamente armazenada em recipiente de vidro, adequadamente limpo, hermeticamente fechado e identificado. Garantindo, assim, a qualidade da droga vegetal por um período maior de tempo e sobretudo mantendo as suas características físico-químicas.

4.2.2 Análises farmacognóstica da droga vegetal

4.2.2.1 Determinação da granulometria do pó do material vegetal

A determinação da distribuição granulométrica é realizada utilizando um conjunto de tamises (peneira constituída de aro e tela em aço ou latão) de abertura nominal, com diferentes tamanhos. Completando o equipamento, foi incorporado um agitador vibratório eletromecânico (movimentos horizontais e verticais uniformes).

O procedimento foi realizado utilizando aproximadamente 25 g do pó da droga vegetal. Primeiramente, o conjunto de tamises foi disposto em ordem decrescente de tamanho das malhas (do maior para o menor respectivamente), sobre o agitador mecânico, provido de tampa e do frasco coletor. Nesse experimento, utilizou-se as seguintes aberturas (Nº / Orifício do tamis): 10 (1,7 mm), 25 (710 µm), 45 (355 µm), 60 (250 µm), 80 (180 µm), 120 (125 µm).

Durante 15 minutos, a amostra foi submetida à passagem forçada através de vibração adequada do aparelho (escala 7) e em seguida as frações recolhidas dos tamises e do fundo coletor, foram pesadas e a porcentagem de pó retido em cada tamis foi calculado, classificando a droga quanto a sua granulometria. O experimento foi realizado em triplicata e o resultado expresso pela média das três determinações (BRASIL, 2019a).

Equação 01: Percentual (%) retido pelos tamis.

O percentual retido em cada tamis, foi obtido utilizando o seguinte cálculo:

$$\% \text{ Retida pelo Tamis} = \frac{P_1}{P_2 \times 100}$$

Onde:

P_1 = Peso da amostra retida em cada tamis (grama)

P_2 = Soma dos pesos retidos em cada tamis e no coletor (grama)

100 = Fator de porcentagem

4.2.2.2 Determinação da perda por dessecação da droga vegetal

A determinação do teor de umidade ou perda por dessecação é realizada utilizando o método da Balança por Infravermelho, que consiste na operação dos seguintes equipamentos: uma balança eletrônica com aquecimento através de uma lâmpada halógena, um sensor de temperatura digital do tipo platina e um programa (software) que processa os dados e emite o resultado. Ambos utilizados em conjunto para analisar o percentual de umidade da amostra submetida à secagem direta por radiação infravermelha.

Para esse teste, primeiramente foi retirado a umidade do equipamento, em seguida foi pesado aproximadamente 1 g de droga vegetal, para ser distribuída de maneira uniforme no coletor (prato de alumínio) do aparelho. Para o acionamento foi pré-definido o tempo e a temperatura, programando o equipamento em: um (1) minuto e 105 °C para secagem. O resultado em teor percentual de umidade foi calculado em leitura direta por diferença de peso, sendo mostrado no display do aparelho. Este procedimento foi repetido em triplicata, calculando as médias e desvios padrões das três determinações (BRASIL, 2019a).

4.2.2.3 Determinação da densidade bruta da droga vegetal

A densidade aparente (densidade bruta) corresponde ao volume ocupado por uma determinada massa de sólido (pó ou granulado), incluindo a porosidade (poros intragranulares) (BRASIL, 2019a).

Para a determinação da densidade bruta foi utilizado o método da proveta. Que consistem em pesar uma proveta graduada de 25 mL vazia e anotar a tara. Em seguida, foi introduzido na proveta o pó vegetal até completar o volume de 15 mL. Durante a transferência do pó para a proveta, foram feitos movimentos visando à remoção do ar entre as partículas (batendo 3 vezes a proveta). Este procedimento consiste, em bater a proveta contra uma superfície rígida, a uma altura de uma polegada (cerca 2,5 cm) em intervalos de 2 segundos entre cada batida, com uma força de baixa intensidade.

Posteriormente, foi realizada a leitura do volume e pesou-se novamente a proveta, agora contendo o pó moderadamente compactado, obtendo assim a massa da amostra (diferença entre o peso da proveta cheia contendo o pó e o peso da

proveta vazia). Este procedimento foi realizado em triplicata, com média e desvio padrão calculado (LACHMAN; LIEBERMAN; KANIG, 2001).

Equação 02: Densidade aparente.

$$\text{Densidade aparente} = \frac{m \text{ (g)}}{V_{\text{ap}} \text{ (mL)}}$$

Onde:

m = massa (g)

V_{ap} = volume aparente (mL), nesse caso o volume aparente (15 mL da amostra)

4.2.2.4 Determinação do teor de cinzas totais da droga vegetal

A quantificação do teor de cinzas totais foi realizada pela determinação do resíduo não volátil da droga vegetal, incluindo: cinzas fisiológicas e cinzas não fisiológicas. De acordo com o que preconiza a Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019). Para o teste, foram utilizados cerca de 3 g da droga vegetal pulverizada, a mesma foi transferida de forma uniforme para um cadinho de porcelana previamente: calcinado, arrefecido e tarado.

Em seguida, a amostra foi incinerada, em forno mufla, aumentando a temperatura gradativamente, até no máximo 450 °C, por 2 horas, atingindo sua decomposição térmica total. Após esse período, o recipiente foi levado a um dessecador para resfriar sob pressão reduzida, por 30 minutos e por último foi pesado em balança analítica, sendo repetida até a obtenção de valores de massa constantes.

A metodologia foi realizada em triplicata, com média e desvio padrão calculado. A porcentagem das cinzas totais em relação a massa da droga, foi alcançada, utilizando os seguintes cálculos:

Equação 03: Determinação do teor de cinzas totais.

01) Cálculo:

$$P2 - P1 = g \text{ (tomada de amostra da droga)}$$

$$P3 - P1 = g \text{ (total de cinzas)}$$

Onde:

P1 → cadinho vazio

P2 → cadinho + droga

P3 → cadinho + cinzas

02) Cálculo do percentual:

$$\frac{\text{g de droga}}{100 \text{ g de droga}} = \frac{\text{g de cinzas}}{X} = \boxed{\text{g \% de cinzas}}$$

X = g % de cinzas

4.2.2.5 Determinação do pH da droga vegetal

A determinação do potencial de hidrogênio iônico (pH) do material vegetal foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando um Phmetro previamente calibrado com soluções tampão 7 e 4. Para essa análise, foi primeiramente preparada uma solução a 1% (p/v) do pó do material vegetal em água destilada. Essa solução foi submetida a aquecimento até ebulição em chapa-elétrica por 5 minutos. Após esse processo, a solução foi filtrada em papel de filtro e depois resfriada até temperatura ambiente (BRASIL, 2019a).

Para obtenção das medidas de pH, o eletrodo e o sensor de temperatura do aparelho foram previamente enxaguados com água destilada e cuidadosamente secos em lenço de papel. Em seguida foram submersos na solução a 1% contida em um béquer de 50 mL. Os resultados obtidos foram mostrados no display do aparelho, sendo registrados, após estabilizar a medição. Foi considerado a média e desvios padrões da triplicata (BRASIL, 2019a).

4.2.2.6 Determinação do índice afrosimétrico ou de espuma

Nesse teste, uma amostra de 1 g do material vegetal, foi transferida para um erlenmeyer contendo 50 mL de água fervente. Foi mantido sob fervura moderada por 30 minutos em chapa aquecedora. Após o resfriamento, a amostra foi separada por filtração e a solução transferida para um balão volumétrico de 100 mL. Os resíduos retidos no papel filtro foram reutilizados para novas extrações através da utilização de porções sucessivas de 10 mL de água fervente até completar o volume de 100 mL.

O decocto obtido foi distribuído em 10 tubos de ensaio com (tampa e numerado). Dispostos em série sucessiva de 1, 2, 3, até 10 mL, o volume de cada

tubo foi ajustado com água destilada até completar 10 mL. Depois foram tampados e agitados vigorosamente, em movimentos verticais por 15 segundos, com duas agitações por segundo, e deixados em repouso por 15 minutos. Em seguida, foi observado se houve a formação de espuma, para então aferir as medidas da altura do anel de espuma, se atingiu 1 cm de altura, após os 15 minutos, verificando-se todos os tubos.

Tabela 1. Índice de espuma.

Tubo 01	Tubo 02	Tubo 03	Tubo 04	Tubo 05	Tubo 06	Tubo 07	Tubo 08	Tubo 09	Tubo 10
1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	7 mL	8 mL	9 mL	10 mL

O resultado é considerado positivo, quando a permanência de espuma é igual ou maior que 1 cm. Outra forma de mensuração é através do cálculo do índice de espuma segundo a equação: $1000/A$, sendo A o volume, em mililitros, do decocto usado para preparação da diluição no tubo onde a espuma foi observada. Este procedimento foi repetido em triplicata, calculando as médias e desvios padrões das três determinações (BRASIL, 2019a).

Equação 04: Teste de espuma

$$\text{Índice de espuma} = \frac{1000}{A}$$

Onde:

1000 = Constante

A = Volume (mL), do decocto utilizado.

4.2.3 Estudos fitoquímicos

4.2.3.1 Preparação da tintura do *Salix humboldtiana*

A tintura de acordo com a Farmacopeia (2019). É a preparação etílica ou hidroetílica resultante da extração de drogas vegetais por maceração ou percolação, utilizando tanto uma parte em massa de droga vegetal e quantidade suficiente do líquido extrator.

No preparo da tintura, o processo extrativo de escolha foi à maceração estática exaustiva, uma operação de extração a frio, no qual a droga vegetal é colocada em recipiente fechado, na temperatura ambiente, durante um período de tempo prolongado em contato com solvente, para a difusão e extração das substâncias químicas contidas no tecido vegetal. Para a tintura do *S. humboldtiana*, foi utilizado como líquido extrator o solvente álcool etílico 70% + água (EtOH:H₂O), equivalente ao título (70:30) vol./vol. de concentração da solução (BRASIL, 2019a).

No procedimento, foram usados cerca de 500 g da droga vegetal em contato com 2.500 mL do líquido extrator, na proporção (1:5) p/v, representado (droga + líquido extrator). No decurso do processo de maceração, período total de 14 dias (7 dias maceração e repetiu-se a operação + 7 dias remaceração, utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator) ocorreu a extração até o esgotamento. O material esteve em pote de vidro, devidamente fechado, identificado, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e agitado de forma aleatória e eventual.

4.2.3.2 Obtenção do extrato seco do *Salix humboldtiana*

Após o processo (maceração + remaceração), o extrato hidroetílico (tintura) foi filtrada e concentrada em rotaevaporador sob baixa pressão, com condições de temperatura e rotação programada e monitorada ($\pm 40^{\circ}\text{C}$ e 40 rpm) até a evaporação do solvente, obtendo-se: EBSH.

Logo em seguida, o extrato foi acondicionado em um frasco de vidro, previamente pesado, identificado e levado à estufa com circulação e renovação de ar na temperatura de 40°C ($\pm 2^{\circ}\text{C}$), até peso constante. Depois o extrato foi mantido em Ultrafreezer em temperatura -40°C . Por último, o extrato foi levado ao liofilizador, sendo parcialmente liofilizado, pois não houve a retirada total da água. Assim, considerado uma liofilização parcial ou incompleta.

4.2.3.3 Prospecção Fitoquímica

Nesta etapa, foram realizados testes químicos de triagem para a caracterização dos metabólitos secundários presentes no EBSH. Estes testes são baseados em reações específicas, utilizando reagentes padrões para: saponinas, açúcares redutores, fenóis, taninos, flavonoides, etc. (BARBOSA et al., 2020).

A análise fitoquímica visa obter o conhecimento dos constituintes químicos de uma espécie vegetal, neste caso o *Salix humboldtiana*. A caracterização dos principais grupos de metabólitos secundários de interesse farmacológico é efetivada pelas reações químicas que resultam no surgimento de coloração e/ou precipitação características. Baseando-se nas propriedades físico-químicas e características comuns aos esqueletos dos diferentes compostos presentes no extrato (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES et al., 2010).

A abordagem fitoquímica foi realizada a partir do EBSH do *S. humboldtiana*, seguindo o livro ALFAFITO (BARBOSA et al., 2020). Pesquisou-se a presença dos metabólitos secundários, por meio da caracterização das diferentes classes de princípios ativos. Todos os testes foram realizados em tubos de ensaios, com a presença do tubo (branco) contendo apenas o meio e os reativos usados em cada teste, para fins de comparação da interferência da cor do extrato. No Quadro 02 mostra-se as classes dos metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2010).

Quadro 02 - Testes de triagem Fitoquímica

CLASSES DE METABÓLITOS	REAGENTES	CLASSES DE METABÓLITOS	REAGENTES
SAPONINAS	Saponina Espumídica	PURINAS	HCl, H ₂ O ₂ e NH ₄ OH
ÁCIDOS ORGÂNICOS	Reativo de Pascová	ESTEROIDES E TRITERPENOIDES	Anidrido acético/ H ₂ SO ₄
AÇÚCARES REDUTORES	Reativo de Fehling	AZULENOS	Dimetilaminobenaldeído e Éter de petróleo
POLISSACARÍDEOS	Reativo de Lugol	CAROTENOIDES	Ácido Trifluoroacético
PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS	Solução de Ninhidrina	DEPSÍDEOS E DEPSIDONAS	Cloreto férrico
FENÓIS E TANINOS	Cloreto férrico	DERIVADOS DE CUMARINA	NaOH/UV
FLAVONOIDES	HCl e Mg	ANTRAQUINONAS	Tolueno e NH ₄ OH
SESQUITERPENOS E OUTRAS LACTONAS	Solução de Cloridrato de Hidroxilamina	GLICOSÍDEOS CARDÍACOS	Reativo de Kedde
ALCALOIDES	Reativo de Bouchardat	CATEQUINAS	Solução de Vanilina
	Reativo de Dragendorff		
	Reativo de Mayer		

4.2.3.4 Fracionamento do EBSH

O fracionamento é um importante método de análise fitoquímica, que consiste na extração por fracionamento, através da técnica de dissolução seletiva, com solventes de polaridade crescentes (FIGURA 17). Nesse processo, os solventes retiram do extrato bruto, por meio de etapas sucessivas, um conjunto de substâncias de solubilidade semelhantes (polaridade) através do arraste por afinidade.

O EBSH, foi fracionado utilizando uma amostra, contendo substâncias de variadas polaridades. Em seguida, o mesmo foi submetido à partição sólido-líquido, seguindo a dissolução fracionada, com solventes orgânicos de polaridade crescente: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol. Mostrado na (FIGURA 21).

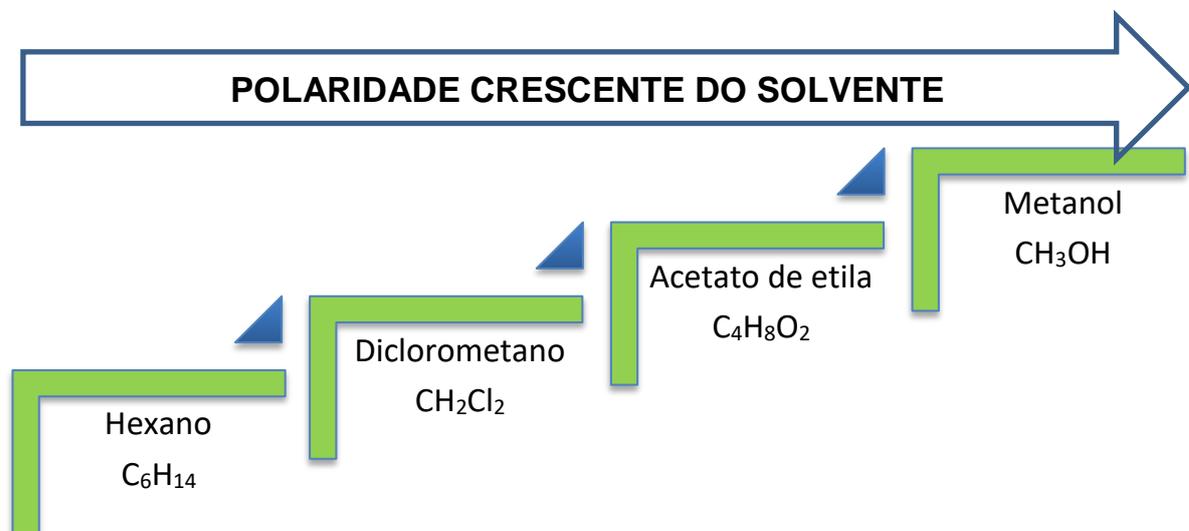


Figura 17. Solventes de polaridade crescente (Método de Fracionamento).

Em via de regra, uma amostra de 4g do EBSH foi pesada e transferido para erlenmeyer de 250mL, onde posteriormente os solventes foram adicionados ao extrato em alíquotas de 50mL, lavados repetidamente (pelo menos 4 vezes) e colocado em banho ultrassônico (sonicador) para acelerar a dissolução das substâncias presentes no extrato e em seguida filtrado em papel filtro qualitativo. Iniciou-se com o hexano.

O filtrado foi então recolhido em outro erlenmeyer para posterior concentração. O resíduo contido no filtro, foi lavado com diclorometano, utilizando-se o mesmo procedimento acima, em que também foi recolhido para posterior concentração. O procedimento também foi realizado para acetato de etila, e metanol, onde por fim, recolheu-se o resíduo final.

Após a extração (particionamento sucessivo), o número de vezes necessárias, para cada solvente, as frações obtidas foram reunidas, concentradas em estufa com circulação e renovação de ar na temperatura de 40 °C (\pm 2°C) e também em rotaevaporador a baixa pressão a 40°C. Até a evaporação completa do solvente e peso constante. O concentrado foi posteriormente pesado, obtendo-se as seguintes frações: hexânica (FHSh), diclorometano (FDSH), acetato de etila (FASh), metanólica (FMSh) do Extrato Bruto etílico do *Salix humboldtiana*.

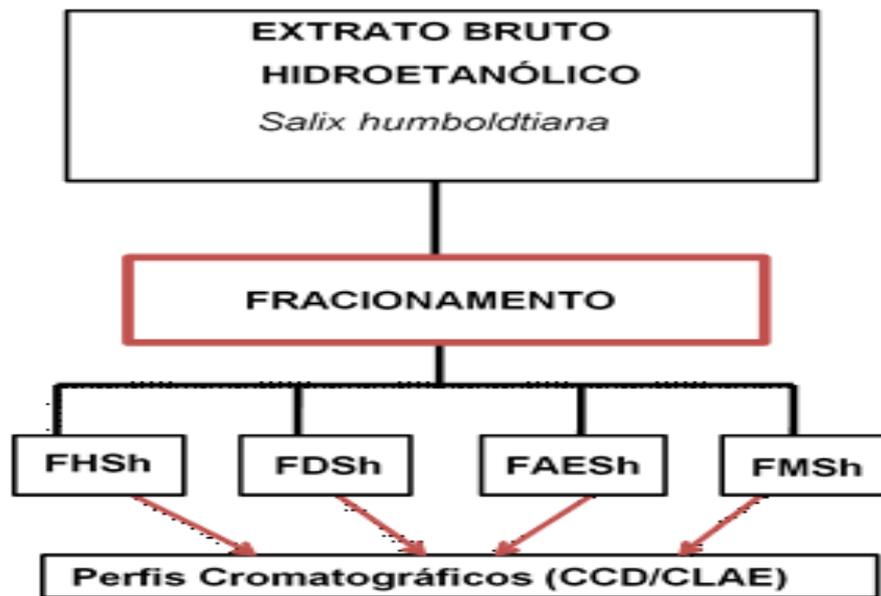


Figura 18. Fluxograma

4.2.3.5 Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A utilização da cromatografia em camada delgada possibilita direcionar as operações de fraçãoamento para o isolamento dos compostos considerados de maior interesse em função dos dados obtidos.

Para análise qualitativa do EBSH (10mg/mL) e frações (10mg/mL) por cromatografia em camada delgada, foi utilizado cromatoplaça padronizada e manufaturada, para as análises preliminares, as quais foram preparadas aplicando-se uniformemente uma suspensão de gel de sílica 60 (MERCK®) em água destilada, na proporção de 1:2 (p/v) sobre placas de vidro de dimensões 10 cm X 5 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura com auxílio de um espalhador manual.

Após o preparo, as placas foram ativadas: primeiro deixando em repouso por cerca de seis horas à temperatura ambiente e depois em estufa a 120°C por aproximadamente 30 minutos.

As amostras (EBSH e frações) foram aplicadas sobre as cromatoplasmas na forma de solução metanólica na concentração de 10 mg/mL, e eluídas em cubas cromatográficas saturadas com a fase móvel de escolha. Foram empregados os seguintes eluentes: hexano/acetona, nas proporções (80:20), (75:25), (70:30); clorofórmio/metanol (90:10) e clorofórmio/metanol/água (75:20:5) e acetato de etila/ácido acético /ácido fórmico/água (100:11:11:26) (WAGNER; BLADT, 2001).

A visualização das bandas foi realizada através de métodos físicos (luz visível e luz ultravioleta nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm) e por revelação empregando derivatização pós-cromatográfica, utilizando os seguintes reveladores: solução de anisaldeído sulfúrico (reagente geral), solução de cloreto férrico e NP/PEG (reagentes específicos).

Com a fase móvel acetato de etila, tolueno e ácido fórmico (85: 10: 5) com observação sob luz UV (254 e 365 nm) e, em seguida, pulverizadas com vanilina sulfúrica e com aquecimento a 110 °C por 5 min para visualizar os componentes fenólicos (WAGNER; BLAT, 2001; WANG et al., 2012).

4.2.3.6 CCD-preparativa da fração FAESh1

As frações acetato de etila (350mg) e metanólica foram submetidas a extração com acetona (10 mL) em banho ultrassom por 5 min. O sobrenadante da fração acetato de etila foi separado por decantação e o solvente evaporado, obtendo-se 275 mg (FASh1) que, em seguida, foi dissolvida em MeOH (1 mL). A fração metanólica se dissolveu completamente na acetona, e não apresentou bons perfis para separação em CCD-preparativa.

A solução metanólica de FASh1 (275 mg/mL) foi aplicada sobre cromatoplasmas padronizadas de gel de sílica 60G - F254 com indicador fluorescente (*MERCK*®), espessura da camada de 0,5 mm e tamanho da placa 20 x 20 cm, utilizando como eluente acetato de etila, tolueno e ácido fórmico (85:10:5). Foram obtidas 4 subfrações (FASh1.1, FASh1.2, FASh1.3, FASh1.4), acondicionadas em frascos, extraídas com MeOH em ultrassom, cada amostra foi evaporada e seus rendimentos calculados.

4.2.4 Análises por CLAE-DAD

4.2.4.1 Preparação das amostras

As amostras de extrato e frações foram injetadas no sistema HPLC-DAD, ambas a 20 mg/mL, diluídas em MeOH grau HPLC. Para comparar os tempos de retenção das amostras, utilizaram-se substâncias de referência, rutina e quercetina (Sigma-Aldrich®), em concentrações de 1mg/mL (m:v), dissolvidos em MeOH HPLC.

4.2.4.2 Condições do método por CLAE-DAD

O perfil cromatográfico de EBSH e suas frações foram determinadas por HPLC-DAD. Os espectros UV-vis foram registrados entre 215 e 400 nm. Os perfis cromatográficos foram registrados em 250 nm; 280 nm; 330 nm e 365 nm

Condições do método:

- Amostras: 10 mg/mL (frações); 20 mg/mL (EBSH)
- Substâncias padrão: Rutina e Quercetina (1 mg/mL);
- Volume de injeção: 10 µL;
- Coluna: C-18 (Thermo ODS Hypersil-C18);
- Dimensões da coluna: 4,6 X 150 mm, 5 µm;
- Temperatura da coluna: 40 °C;
- Fluxo: 0,8 mL/min;
- Sistema eluente: H₂O ultrapura (A) a pH 3 por Ác. Fórmico (0,03% v/v) e B (ACN).

Tabela 2. Condição da eluição gradiente CLAE-DAD.

Tempo (min)	A (%)	B (%)
0	95	5
20	5	95

4.2.4.3 Instrumentação do método

As análises HPLC-DAD foram conduzidas usando um instrumento da série Infinity Agilent 1260 modelo G1361A acoplado a um detector de arranjo de diodos (DAD) modelo G1315C, gerenciado pelo software OpenLab ChemStation® versão A.01.05 (Agilent Technologies).

4.2.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EBSH em modelo zebrafish

A avaliação da atividade anti-inflamatória do EBSH, foi realizada *in vivo*, utilizando como “organismo-modelo” à espécie *Danio rerio* (zebrafish), as análises foram conduzidas em parceria com o Laboratório de Pesquisa em Fármacos da Universidade Federal do Amapá (UNIFAP), localizada no município de Macapá, sob supervisão do Professor Dr. José Carlos Tavares Carvalho.

4.2.5.1 Animais em estudo

Para a avaliação da atividade anti-inflamatória *in vivo* foram utilizados para os ensaios: Peixes certificados, adultos (6-9 meses de vida) de ambos os sexos e proporção, tamanho (2 ± 5 cm) e peso ($0,2 \pm 1$ g), da espécie *Danio rerio* conhecidos como “zebrafish”, de linhagem *Wide Type* “Selvagens” por não apresentarem nenhuma alteração artificial na estrutura genética. Mantidos em aquários sob condições de monitoramento dos parâmetros físico-químico/ambientais. Todos os animais eram “*Naive*”, saudáveis e livres de sinais de doenças (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; DAMMSKI et al., 2011).

4.2.5.2 Bioensaios em zebrafish (*Danio rerio*)

Os ensaios *in vivo*, utilizando “Organismo-modelo” zebrafish (*Danio rerio*) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no Uso Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), sob o número do Parecer: 4.210.040 (ANEXO A).

4.2.5.3 *Danio rerio*: Características e vantagens como modelo animal

O zebrafish foi escolhido como organismo-modelo neste trabalho, devido às suas características e vantagens em comparação a outras espécies. Os aspectos biológicos, como semelhanças estruturais, funcionais, moleculares e genéticas, análogas a espécie humana, assim como os seus órgãos são uma versão menor, realizando as mesmas funções ou equivalentes (HOWE et al., 2013; STUELLEN et al., 2018; DAMMSKI et al., 2011; HILL et al., 2005; KIMMEL et al., 1995; BARBAZUK et al., 2000).

A espécie apresenta reduzido tamanho e peso corporal, sendo necessário a administração de substâncias para testes com doses em baixas concentrações (μg e/ou μM). As baixas doses exigidas são adequadas para as pesquisas de novas drogas, produtos naturais e principalmente extratos vegetais (ROSEMBERG et al., 2011; SCHNEIDER et al., 2009; HILL et al., 2005; RENSHAW; TRADE, 2012; STUELTEN et al., 2018).

4.2.5.4 Obtenção dos peixes

Os exemplares de zebrafish (*Danio rerio*) foram adquiridos mediante compra no comércio atacadista de animais vivos, via Empresa especializada, dispondo de todos os documentos de autorização de uso, licenças e registros nos órgãos competentes ambientais e sanitários. Os mesmos foram transportados por linha aérea até o local de destino Macapá/AP (UNIFAP), em condições indicadas pelo produtor e seguindo as normas vigentes.

4.2.5.5 Instalação, manutenção e acondicionamento dos animais

Os animais utilizados neste ensaio, foram mantidos em quarentena, para ambientação, logo após que chegaram na plataforma zebrafish do laboratório da UNIFAP. Sendo acondicionados e mantidos em reservatórios do tipo tanques de vidros (Figura 19). Com água filtrada, desclorada e com aeração constante, sob controle dos parâmetros: temperatura de 26°C , pH alcalino e com fotoperíodo 14/10h claro/escuro. Seguindo os protocolos padronizados nos manuais de criação de zebrafish (WESTERFIELD, 2000; DAMMSKI et al., 2011).

A plataforma zebrafish da UNIFAP é licenciada e constituída pelo biotério, uma instalação onde é permitido a criação, acondicionamento e manutenção dos peixes que serão posteriormente utilizados como modelos nas pesquisas (experimentação) e no ensino. Sendo um local com condições controladas em nível: ambiental, nutricional e sanitário. Tendo uma equipe responsável pelos cuidados (recepção, aclimação, manuseio e manutenção) desses animais.

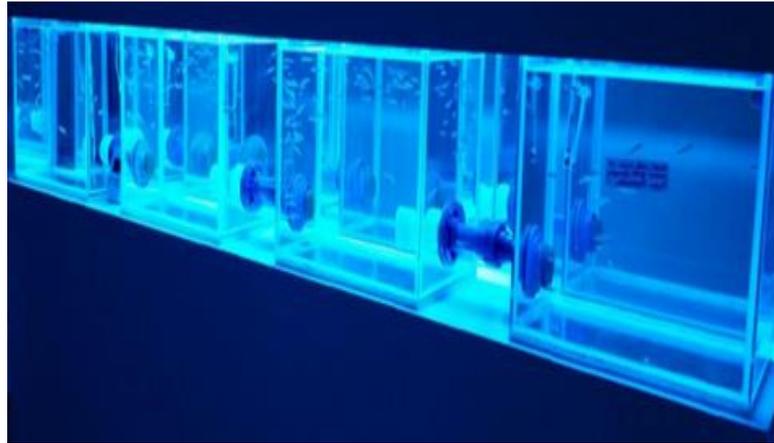


Figura 19. Plataforma Zebrafish - UNIFAP. Fonte: Silva, 2016.

O método descrito por Westerfield (2000) e por Dammski e colaboradores (2011) foram utilizados como base no sistema de criação de peixes em biotério (Tanque + filtros + água + peixe), levando em consideração: bem-estar, reprodução, desenvolvimento, manutenção e o acondicionamento animal. Dessa forma são imprescindíveis os fatores específicos do sistema, sobretudo: as características e qualidade da água; alimentação (nutrição); condições de infraestrutura (equipamentos e instalações); manutenção (higiene) e controle de parâmetros/testes (físicos, químicos e microbiológicos).

Os testes dos parâmetros de controle de qualidade da água são: físicos, químicos e microbiológicos. As análises físicas correspondem: coloração, turbidez, transparência e temperatura (WESTERFIELD, 2000; LAWRENCE; HARPER, 2010; DAMMSKI et al., 2011).

Os testes químicos analisam: pH, alcalinidade, salinidade, dureza, concentração de oxigênio dissolvido, além das concentrações dos compostos nitrogenados: amônia, nitrito e nitrato (LAWRENCE; HARPER, 2010).

Os testes microbiológicos investigam a presença de agentes patogênicos no ambiente aquático: bactérias, vírus, protozoários e fungos. Através da identificação de alterações nos animais, sinais cutâneos de infecções e por meio da percepção de mudanças no odor e na coloração da água, também pode ser feito exames de cultura para detectar o tipo de microrganismo causador das doenças (LAWRENCE; HARPER, 2010; DAMMSKI et al., 2011).

Tabela 3. Parâmetros: níveis adequados e frequência de testes recomendados para o zebrafish.

Parâmetro	Recomendado	Frequência de teste
Salinidade	0,5 – 2 g/L	Diária
Temperatura	24 - 28 °C	Diária
pH	6,9 – 7,5 (alcalino)	Diária
Amônia total (NH ₃)	< 0,02 mg/L	Semanal
Nitrito	< 0,1 mg/L	Semanal
Nitrato	Até 200 mg/L	Semanal
Alcalinidade	50 – 100 mg/L de CaCo ₃	Mensal
Dureza	75 – 200 mg/L	Mensal
Oxigênio dissolvido	Acima de 4 mg/L	Mensal
Densidade do estoque	< 7 peixes/L	---
Iluminação	12 – 14 h/dia	Ciclo diário
Condutividade	300 e os 1500 µS	---

Adaptado de Manual de criação em biotério “The Laboratory Zebrafish” 1ª ed. 2011.

Com relação à alimentação (Nutrição) dos animais utilizados neste ensaio, eles foram alimentados com formulações comerciais processadas (Rações extrusadas) 45% de proteína bruta de nome comercial *Tetramin*[®] em flocos, duas vezes ao dia (manhã e tarde) por meio de distribuição manual (RESENDE; SOCCOL, 2015).

Na infraestrutura do sistema de criação e alojamento para o zebrafish (biotério), é composto de dois pilares: as instalações (elétrica, hidráulica e espaço físico) e os equipamentos (tanques, estantes de bancada e o sistema de tratamento da água) (DAMMSKI et al., 2011; WESTERFIELD, 2000).

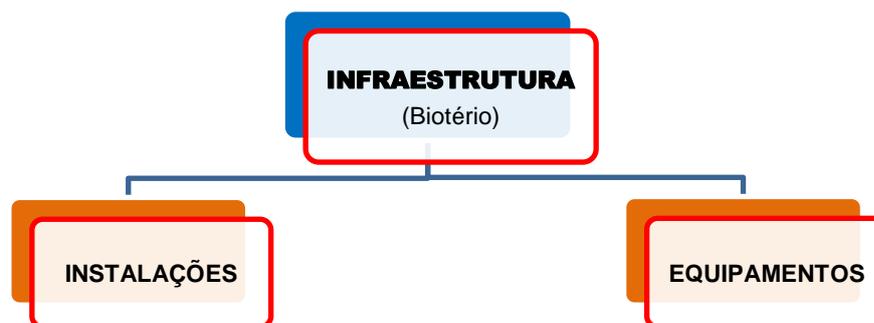


Figura 20. Infraestrutura dos Biotérios (Sistema de Alojamento para Zebrafish).

A configuração do biotério da plataforma zebrafish, corresponde a: Paramentação, pesquisas, cuidado e armazenamento dos peixes. Os espaços apresentam superfícies (impermeáveis, laváveis e resistentes). O acesso ao biotério é restrito e a entrada é única. Os equipamentos e acessórios do biotério são compostos pelo tripé: tanques, estantes de bancadas e sistema de tratamento (WESTERFIELD, 2000; DAMMSKI et al., 2011; RESENDE; SOCCOL, 2015).



Figura 21. Tripé dos equipamentos no Sistema de Alojamento para Zebrafish.

O sistema de tratamento de água é composto por filtros que realizam a filtração de forma contínua, podendo ser: mecânica, química e biológica. A filtração mecânica é o primeiro estágio, ocorre a retenção física de partículas suspensas na água, por meio de espumas fibrosas e/ou esponjas. A filtração biológica é a segunda e envolve a decomposição de resíduos por bactérias benéficas que oxidam a amônia tóxica. A terceira etapa é filtração química com carvão ativado para eliminar partículas dissolvidas na água em nível molecular. O último estágio é a esterilização, com a emissão de radiação (UV), que penetra no microrganismo, destruindo as ligações do DNA (DAMMSKI et al., 2011; WESTERFIELD, 2000).

4.2.5.6 Grupos de tratamento

Neste trabalho os estudos e ensaios foram randomizados e controlados o delineamento e investigação partiu da causa em direção ao efeito, as substâncias utilizadas foram codificadas, sendo administradas: Indometacina, solução salina (PBS), extratos (EBSH e EASH) e carragenina a 1% (BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2017).

Quanto aos grupos de tratamento, foram utilizados aleatoriamente, 56 peixes adultos (6-9 meses de idade) de ambos os sexos, tamanho médio 2 ± 5 cm e peso $0,2 \pm 1,0$ g mantidos em ambiente controlado (temperatura de $26 \pm 2^\circ\text{C}$ e pH alcalino entre 6,9 – 7,5 com um ciclo de 14/10h claro/escuro) (CARVALHO et al., 2017; DAMMSKI et al., 2011).

Os animais foram pesados individualmente em balança analítica, e organizados de acordo com o peso e então divididos em 8 grupos com 7 animais cada ($n=7/\text{cada}$). Todos os animais usados neste trabalho eram saudáveis e livres de sinais de doenças (COLLYOMORE et al., 2013; BORGES, 2018; CARVALHO et al., 2017).

Tabela 4. Grupos de administração.

Grupo I	Controle	Indometacina via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.
	Positivo	
Grupo II	Controle	Solução salina via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.
	Negativo	
Grupo III	Branco	(Solução salina + solução de PBS via intraperitoneal).
Grupo IV	75 mg	EBSH 75 mg/Kg via oral + carragenina solubilizada em PBS, via intraperitoneal.
Grupo V	150 mg	EBSH 150 mg/Kg via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.
Grupo VI	300 mg	EBSH 300 mg/Kg por via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.
Grupo VII	500 mg	EBSH 500 mg/Kg via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.
Grupo VIII	750 mg	EBSH 750 mg/Kg via oral + carragenina solubilizada em PBS via intraperitoneal.

4.2.5.7 Vias de administração (gavagem e injeção intraperitoneal)

Os testes foram realizados através da administração por via oral (gavagem) de Indometacina e do extrato bruto nas seguintes concentrações: 75 mg/Kg; 150 mg/Kg; 300 mg/Kg, 500 mg/Kg e 750 mg/Kg (Figura 22), uma hora antes da aplicação peritoneal (abdominal) de carragenina.

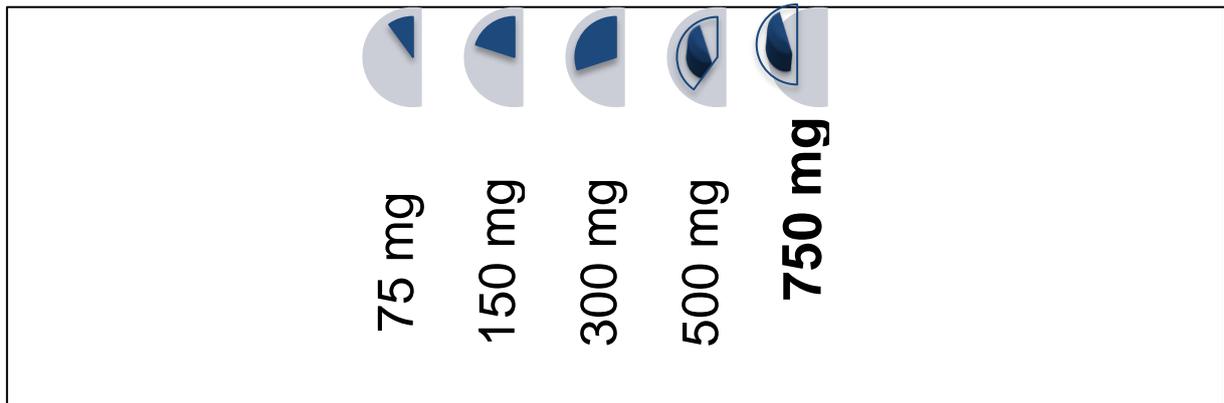


Figura 22. Esquema das concentrações dos extratos do *Salix humboldtiana*.

Alguns cuidados foram necessários para realização dos testes, inicialmente foram organizados os materiais e insumos utilizados para o procedimento. Por meio da conferência e separação dos materiais: descartáveis (seringas, agulhas estéreis), dispositivos plásticos, recipientes, micropipeta, esponja, etc. além da ação de limpeza e programação dos equipamentos e acessórios utilizados na pesagem, imobilização, anestesia e injeção nos animais (MAGALHÃES et al., 2017).

O segundo cuidado, foi em relação ao preparo e manuseio dos animais, eles foram colocados em jejum de 24 horas, em seguida foram pesados e classificados em grupos de acordo com as massas corpóreas. Logo após foram anestesiados, neste caso em água fria (2°C a 8°C), para depois ser imobilizado, posicionado e apoiado com auxílio de uma esponja macia e úmida contendo uma fenda longitudinal, 10-15 mm de profundidade, servindo de espaço (canal) para colocação do animal na posição de peito para cima e cabeça um pouco para fora da esponja (BORGES, 2018; KINKEL et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2017).

Outro passo do experimento, foi a administração da substância teste através da gavagem, foi introduzido no trato gastrointestinal (TGI), um volume predeterminado da substância em questão (EBSH) de 5 µL, sendo utilizado micropipeta de 2-20 µL (COLLYMORE et al., 2013; MAGALHÃES et al., 2017; CARVALHO et al., 2017).

Neste trabalho, utilizou-se a ponteira da micropipeta ponta fina (31,9 mm), a mesma foi introduzida na cavidade oral do animal até que a ponta se estendesse além das brânquias (aproximadamente 1 cm), a solução foi então injetada lentamente no tubo digestivo, caso houvesse a percepção de resistência, o procedimento era interrompido e repetido até efetuar a administração por gavagem (COLLYMORE et al., 2013; BORGES, 2018; BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

Após o intervalo de 1 hora, foi administrada a solução de carragenina (20 µL) via intraperitoneal (abdômen) na concentração 5 mg/mL, os animais também receberam anestesia (água gelada 2-8°C). As injeções utilizadas (Seringa 1cc e agulha adaptada calibre 13 x 0,4 mm ou 26 G ½”). O peixe recebeu a mesma técnica de imobilização da gavagem, foi apoiado com auxílio de uma esponja e posicionado com a cabeça voltada para a fora e o abdômen para cima (KINKEL et al., 2010; CARVALHO et al., 2017).

No momento da administração da injeção, as barbatanas peitorais serviram como um ponto de referência do limite abdominal, a agulha foi mantida paralela à coluna vertebral e foi inserida na linha média do abdômen posteriormente às barbatanas peitorais, a agulha foi inserida um pouco além do bisel em ângulo de 15°, assim cuidadosamente, na profundidade de 1 mm na cavidade abdominal e injetado lentamente a solução de carragenina (KINKEL et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2017).

Quadro 03 - Cuidados, etapas e procedimentos nos testes em zebrafish

Cuidados	Etapas	Procedimentos
Organização dos materiais e insumos	Conferência e Separação	1. Programação dos insumos 2. Organização dos descartáveis 3. Conferência dos itens necessários
Preparo e Manuseio do animal (zebrafish)	Preparo	4. Jejum 5. Pesagem 6. Classificação em grupos por peso
	Anestesia	7. Imersão em água fria 8. Imobilização e Posicionamento
	Gavagem	9. Introdução no TGI
	Injeção peritoneal	10. Administração da injeção
	Recuperação	11. Observação e repouso

4.2.5.8 Indução da inflamação e mensuração do edema

Neste trabalho, optou-se pelo modelo experimental de edema peritoneal (abdominal), induzido por solução de carragenina, em zebrafish, uma vez que é uma técnica de fácil execução e considerado um bom modelo para avaliar a atividade biológica do princípio ativo, fármaco ou extrato com possível propriedade anti-

inflamatória e que possa inibir a formação de edema. Além de outra vantagem quando comparada a relação entre a técnica e o modelo animal, a possibilidade de utilização de baixas doses (cálculo baseado no peso corporal do peixe) em comparação aos modelos tradicionais.

A indução da inflamação foi conduzida conforme descrito por Huang et al. (2014) com adaptações, que consiste na administração de 20 μ L (300 μ g) de carragenina a 1% (Carrageenan Kappa, Sigma) solubilizada em tampão PBS, via injeção intraperitoneal (SILVA, 2016).

A mensuração do edema, foi realizada mediante a pesagem dos animais de forma individual no início e fim do experimento (5 horas após a injeção de carragenina) em uma balança analítica (Bioprecisa), e então fotografados com auxílio de câmera digital (Iphone 7s modelo: A1778). Além disso, eles também foram medidos na região abdominal antes e depois, com auxílio de paquímetro digital (BORGES et al., 2018).

Logo, a formação de edema e sua inibição foi quantificada por mudanças no volume dessa região e no peso do animal principalmente. O cálculo foi realizado através da diferença entre os valores do peso inicial antes da aplicação da carragenina (Tempo zero) e o peso após a injeção, medidas no (Tempo 5 horas) após o desenvolvimento do edema (SILVA, 2016; BATISTA et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2017).

Equação 05: Mensuração do edema.

Medida do edema ($P_f - P_i = P_r$ em mg)

P_i = Peso inicial (Tempo zero)

P_f = Peso final (Tempo após 5 horas)

P_r = Peso resultante

4.2.5.9 Análise de comportamento

A avaliação das reações nos parâmetros comportamentais do zebrafish, foram conforme descritos por Souza et al. (2016), com adaptações. Os animais foram mantidos em jejum por 24h antes do experimento. Após os procedimentos (gavagem e administração injetável de carragenina), os animais foram distribuídos individualmente em béqueres de mesmo volume, contendo água do sistema.

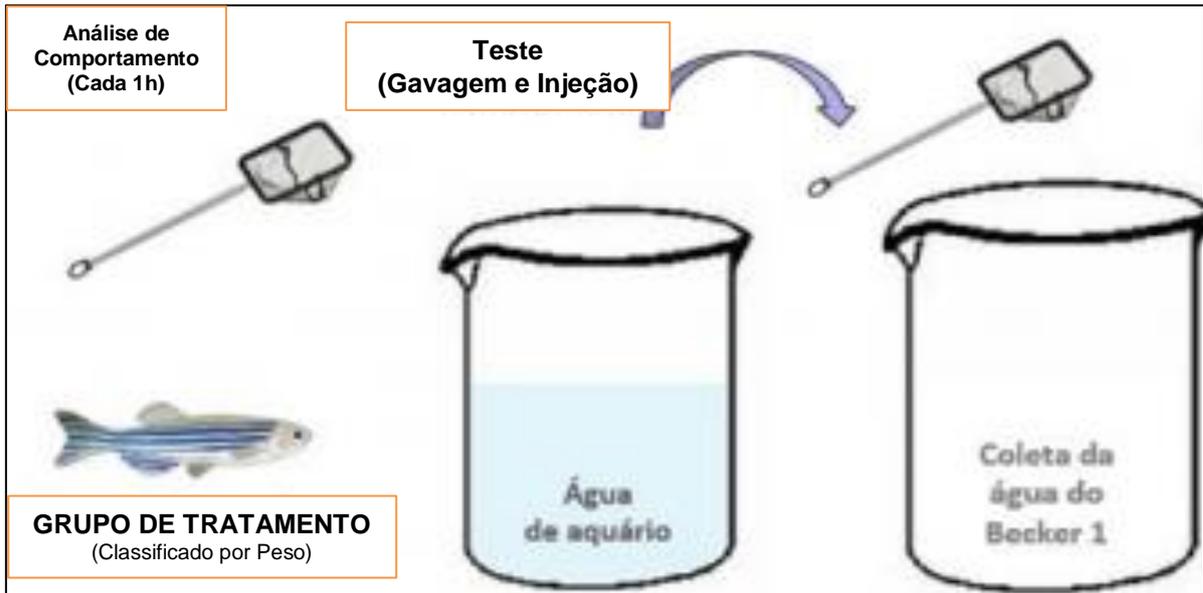


Figura 23. Procedimento de separação individual do zebrafish. Adaptado de Brito, 2018.

O comportamento dos animais foi observado por meio de visualização direta, a cada uma hora, totalizando 5 horas que seguiram o tratamento. As alterações de comportamento classificam-se em quatro estágios: I (Aumento da atividade natatória / Espasmos / tremores no eixo da cauda), II (Nado circular / Perda de postura / Perda de equilíbrio), III (Agitação e respiração superficial aérea) e IV (Hipoatividade natatória / repouso no fundo / morte) (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018).

Quadro 04 - Análise comportamental do zebrafish em 4 estágios

Estágio	Nível de Alteração	Eventos Comportamentais
Estágio I	Leve	a) Hiperatividade natatória; b) Espasmo; c) Tremores de cauda.
Estágio II	Leve-moderado	a) Nado circular; b) Perda de postura e equilíbrio.
Estágio III	Moderado	a) Agitação com respiração superficial aérea.
Estágio IV	Intenso	a) Perda da motilidade; b) Deposição no fundo aquário; c) Morte.

Fonte: adaptado de Souza et al., 2016.

4.2.5.10 Monitoramento da mortalidade e Eutanásia

Após o término do experimento, os peixes restantes, foram eutanasiados por imersão em solução de gelo com água na proporção de 4:1, entre 2°C a 4 °C, o método de escolha foi o físico, choque hipotérmico. Os animais foram monitorados continuamente e permaneceram até que não foi possível perceber movimentos operculares, sendo considerados mortos (WILSON; BUNTE; CARTY, 2009).

Depois da eutanásia, os peixes foram armazenados em cassetes individuais, apropriados e identificados, sendo imersos em solução “Bouin”. Logo em seguida, foram levados para o congelamento, para o estudo histopatológico, com a finalidade de verificar as possíveis alterações teciduais causadas pela indução da inflamação e administração dos extratos (BORGES et al., 2018).

4.2.6 Análise estatística

Para análise estatística dos resultados, foi aplicado o teste t de Student (Equação: 06) utilizando o programa (BioEstat 5.0). Para a comparação dos vários parâmetros, entre as médias e desvio-padrão, obtidos pelos métodos experimentais realizados nesta pesquisa. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão (AYRES et al., 2007).

$$t = \frac{X_a - X_b}{\sqrt{S_o^2 (1/n_a + 1/n_b)}}$$

Equação 06: Teste t de Student. Fonte: CALLEGARI-JACQUES, 2003.

Em que X_a e X_b são as médias obtidas pelos diferentes métodos, S_o^2 é a variância média, n_a e n_b o número de amostras de cada grupo. O teste foi empregado com nível de confiança de 95% e nível de significância $\alpha = 5\%$ ($p \leq 0,05$) (CALLEGARI-JACQUES, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tendo em vista, a realização deste trabalho de pesquisa, representado por: aspectos farmacognósticos (testes físicos, químicos e físico-químicos); investigação fitoquímica (prospecção, fracionamento e CCD); análise CLAE-DAD (perfil cromatográfico e caracterização das substâncias) e bioensaios (atividade biológica de avaliação anti-inflamatória), do EBSH de folhas do *Salix humboldtiana*. Estas pesquisas trouxeram informações e resultados, que serão descritos e discutidos adiante, a fim de qualificar a utilização desta espécie na fitoterapia popular e contribuir para a padronização da forma de emprego enquanto recurso fitoterápico.

5.1 PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL E OBTENÇÃO DO EXTRATO

O processamento foi realizado de forma meticulosa, objetivando garantir a manutenção da qualidade do material vegetal por um tempo mais longo. Evitando assim, a proliferação de microrganismos, inibindo a atividade enzimática e o metabolismo e, sobretudo mantendo a estabilidade e as características físico-químicas da droga vegetal do *S. humboldtiana* (JUNIOR, 2003; YUNES; CALIXTO, 2001; ZHANG et al., 2007; SIMÕES et al., 2010; KRAUZE; SZUMOWICZ, 2004).

Partindo de um total de amostra, aproximadamente 1,1 kg de material vegetal (Folhas + galhos), após a seleção (separação manual), foram obtidos cerca de 829 g de matéria-prima vegetal, folhas do *Salix humboldtiana*, que depois de pulverizadas renderam 778 g de pó da droga vegetal.

Para o processo extrativo, usou-se uma amostra de 500 g da droga vegetal, que produziu 26,55 g de EBSH. A técnica de extração de escolha foi à maceração estática exaustiva, uma operação de extração a frio, no qual a droga vegetal é colocada em recipiente fechado, na temperatura ambiente, durante um período de tempo prolongado em contato com solvente, para a difusão e extração das substâncias químicas contidas no tecido vegetal.

Para a tintura do *S. humboldtiana*, foi utilizado como líquido extrator o solvente álcool etílico 70% + água (EtOH:H₂O), equivalente ao título (70:30) vol./vol. de concentração da solução (BRASIL, 2019a).

No procedimento, foram usados cerca de 500 g da droga vegetal em contato com 2.500 mL do líquido extrator, na proporção (1:5) p/v, representado (droga +

líquido extrator) ou relação droga vegetal: derivado vegetal (1,100 : 26,55). No decurso do processo de maceração, período total de 14 dias (7 dias maceração e repetiu-se a operação + 7 dias remaceração, utilizando o mesmo material vegetal, renovando-se apenas o líquido extrator) ocorreu a extração até o esgotamento. O material esteve em pote de vidro, devidamente fechado, identificado, ao abrigo da luz, em temperatura ambiente e agitado de forma aleatória e eventual, posteriormente foi submetido a concentração e secagem respectivamente por rota-evaporador e estufa. De acordo com a descrição na tabela abaixo.

Tabela 5. Etapas do processamento e rendimento da matéria-prima vegetal, droga e extrato.

Material	Massa
Material vegetal (Folhas secas + galhos)	1,1 kg
Matéria-prima (Após seleção manual)	829 g
Droga vegetal (Folhas secas pulverizadas)	778 g
Amostra da droga vegetal macerada	500 g
Extrato Bruto Hidroetílico do <i>S. humboldtiana</i> (EBHSh)	26,55 g

Essa diferença de massas, durante o processamento (Início e fim), sobretudo a partir da seleção manual, se deve pela compactação do material, diminuindo assim, o espaço físico entre os fragmentos e porções do material vegetal, resultando em menor quantidade de ar entre os espaços, conseqüentemente menor massa. Além disso, no próprio processo ocorrem pequenas perdas com as transferências do material de um recipiente para outro e nos resíduos retidos no triturador (moinho de facas) (SIMÕES et al., 2010; RAMBO et al., 2015).

Importante salientar, que a parte utilizada neste estudo, foram as partes aéreas, retirando-se os galhos na seleção manual. Devido seu maior aproveitamento de extrativos, e rendimento melhor das regiões menos rígidas (folhas) (SIMÕES et al., 2010).

5.2 RENDIMENTO DO EBSH

Neste trabalho, após o processo extrativo e concentração, o rendimento alcançado, por meio da maceração e remaceração em (14 dias totais) da droga vegetal, forneceu 26,55 g de extrato bruto hidroetílico do *S. humboldtiana*, representando um rendimento 5,31 % em relação à quantidade de droga utilizada, conforme (Tabela 5).

O rendimento da extração dos compostos das drogas vegetais é determinado pelas condições em que o processo de extração é realizado e a natureza química dos componentes envolvidos. A escolha do solvente, temperatura de extração, ação mecânica (agitação) e pressão, são imprescindíveis. Além desses, a matriz vegetal possui uma microestrutura complexa formada por células, espaços intracelulares, capilares e poros, que efetivamente afetam o processo extrativo e conseqüentemente o rendimento (WONGKITTIPONG et al., 2004; PINELO et al., 2004).

Dessa forma, a extração é influenciada pela estrutura molecular do soluto, tamanho, localização e a sua interação com o solvente, assim como as características físico-química do solvente. Logo a estrutura e a composição distinta dos produtos naturais, asseguram que cada complexo soluto-solvente mostre comportamento específico, o qual não pode ser previsto com facilidade (PINELO et al., 2004).

Nesta pesquisa, a escolha do solvente e o tipo de método de extração, foram essenciais, levando em consideração, aspectos como: custo, praticidade, eficiência e rendimento. Desta forma, o solvente utilizado foi a solução de álcool etílico a 70%, neste caso uma mistura de EtOH:H₂O (70:30 v/v) (BRASIL, 2014).

Neste modo, pode-se alcançar a extração do máximo de substâncias bioativas de interesse. O álcool etílico a 70% é um solvente de polaridade adequada, para os tipos de substâncias desejadas, correspondente principalmente aos compostos fenólicos (flavonoides, fenóis e taninos). Em sua maioria, esses compostos são bastante polares, por isso a escolha de um solvente de polaridade elevada (SIMÕES et al., 2010). O rendimento obtido com a extração hidroalcoólica com etanol a 70% esteve adequado, resultando em um maior aproveitamento de extrativos (SIMÕES et al., 2010; PINELO et al., 2004).

Vale ressaltar, que a água como sendo um dos solventes mais comumente utilizados pela população para a extração dos princípios ativos vegetais. No entanto, é o álcool que possibilita a extração de um maior número de compostos. Preparações

hidroalcoólicas, como a utilizada para a produção do extrato em estudo (EBSH), apresentam grande eficácia quanto à solubilidade de constituintes fitoquímicos, além de possibilitar uma abordagem voltada para o uso popular (SIMÕES et al., 2010).

Por fim, a escolha da técnica de extração adequada e o uso do solvente apropriado é representado por critérios de uso popular/tradicional e a farmacopeia (SANTOS, 2013; VIERA, 2016; PINELO et al., 2004).



Figura 24. Fluxograma do passo a passo do processamento do material vegetal (extração e rendimento).

5.3 ANÁLISE FARMACOGNÓSTICA

Em razão da relevante utilização da família Salicaceae e do gênero *Salix*, na medicina popular e terapêutica, o estudo de parâmetros farmacognósticos são importantes pois auxiliam na identificação do material vegetal, quando comparados a monografias e outros formulários oficiais que normatizam e regulamentam o uso das drogas vegetais. Assim como, permitem avaliar e garantir o controle de qualidade do material vegetal utilizado (RODRIGUES et al., 2015).

Contudo, no estudo fitoquímico, padronizar extratos farmacopeicos baseados no uso popular ou tradicional. A avaliação farmacognóstica é uma importante etapa, pois, a partir dela é possível realizar um bom planejamento, com melhoria da qualidade, eficiência e do rendimento do processo extrativo, por meio de análise da matéria-prima vegetal (COSTA, 1994; BANDEIRA, 2004).

Portanto, antes de executar uma extração, deve-se levar em consideração o chamado planejamento fatorial, uma série de fatores: físicos, químicos e físico-

químicos, que possam interferir e afetar a operação de extração. Esses parâmetros, podem ser mensurados e exemplificados por: análise granulométrica, análise de pH, análise de densidade aparente, análise de perda por dessecação, análise do teor de cinzas totais, análise do índice de espuma, entre outros testes (SOARES et al., 1998; BRASIL, 2019a).

5.3.1 Determinação da Granulometria

A granulometria foi avaliada em triplicata e demonstrou que 64,60% do pó de folhas do *Salix humboldtiana* ficaram retidos no tamis de malha com abertura de 710 μm , e menos de 25% da totalidade, no tamis com abertura nominal de malha de 355 μm (Tabela 6). De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6^a. Ed. (2019), o pó é classificado como moderadamente grosso.

Tabela 6. Análise granulométrica do pó de folhas do *Salix humboldtiana*.

Tamanho da malha	Média (%) do Pó retidos pelo tamis	Desvio padrão (\pm)
1.700 μm	0,22	\pm 0,00
710 μm	64,6	\pm 7,60
355 μm	24,9	\pm 5,41
250 μm	4,78	\pm 2,55
180 μm	3,14	\pm 1,34
125 μm	1,87	\pm 0,74
Tamis coletor	0,49	\pm 0,52

O número do tamis corresponde à classificação da Associação Brasileira de Normas Técnicas (1984), ISO 33101:2000. A determinação da granulometria da droga vegetal avalia um parâmetro que permite aumentar a eficiência do processo de extração, já que, partículas muito finas se compactam e assim, reduzem a penetração do líquido extrator e ainda, bloqueiam os poros dos filtros e com isso, dificultam a filtração. Dessa forma, o pó de folhas do *S. humboldtiana*, são moderadamente grossos, sendo adequados para realizar estudos fitoquímicos, por trazer vantagens competitiva, na solubilidade da droga, facilitando a extração, pois apresenta uma boa superfície de contato, devido maior área de superfície, ao mesmo tempo, sem gerar compactação excessiva do pó, o que poderia atrapalhar o processo de extração por solventes e também prejudicar a filtração (BRASIL, 2019a; ZHANG et al., 2007).

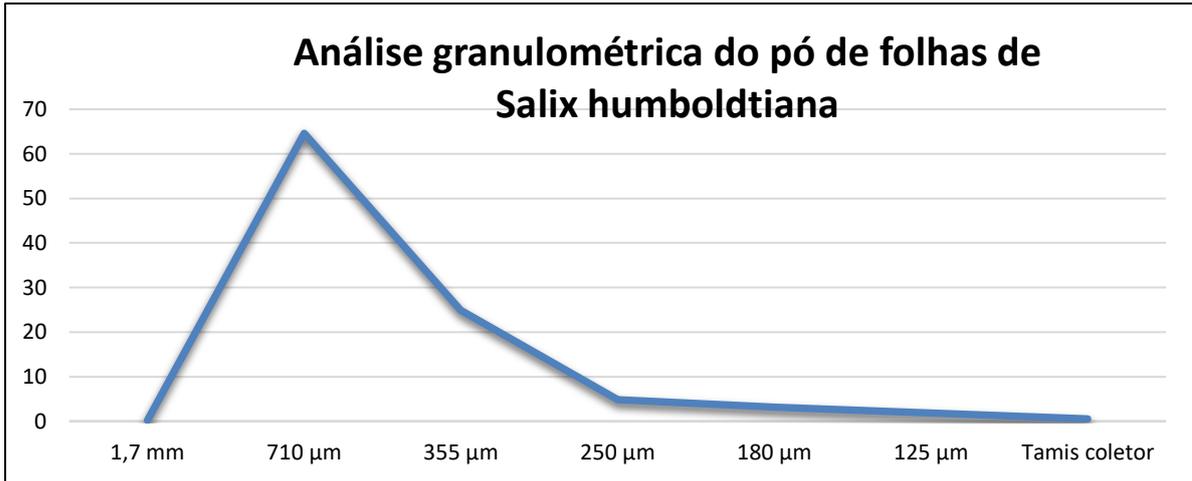


Figura 25. Gráfico do percentual de pó retido X tamanho do tamis.

5.3.2 Determinação da perda por dessecação do material vegetal

O teor de umidade e os voláteis residuais, a média e o desvio padrão das três determinações da perda por dessecação da droga do *S. humboldtiana*, obtidas através do Infratest, resultou no valor 9,75% de teor de umidade. De acordo com a Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019), este valor se encontra dentro dos limites estabelecidos para plantas medicinais, que é de 8% a 14%. A determinação do teor de umidade residual, presente nas drogas vegetais, constitui um importante índice de qualidade de sua preparação e da garantia de sua conservação (COSTA, 2001; BRASIL, 2019a).

Desta forma, o valor estabelecido neste parâmetro, indica uma secagem eficiente da matéria prima vegetal, assim como, uma consequente estabilidade microbiológica da droga, em termos de proliferação de bactérias e fungos, ou seja, expressão de sua susceptibilidade ao desenvolvimento de microrganismos. Ademais, o teor de umidade, influencia diretamente a estabilidade química, representada especialmente pelos processos de hidrólise e atividade enzimática, com consequente degradação dos constituintes químicos e dos metabólitos secundários (WHO, 1998; SIMÕES et al., 2010; OLIVEIRA, 1997; SHARAPIN, 2000).

Portanto o valor de 9,75% de teor de umidade da amostra do *S. humboldtiana*, indica que o material teve armazenamento e secagem adequados. Estando diretamente relacionado, como indicativo de qualidade, sobretudo nos aspectos da durabilidade do produto, estabilidade química, biológica, sua preparação e conservação (SIMÕES et al., 2010; BRASIL, 2019a).

5.3.3 Determinação da densidade bruta

A densidade aparente do pó de folhas do *S. humboldtiana*, com média e desvio padrão, foi de 0,39 g/mL \pm 0,01. O valor mensurado foi baixo, isto é, menor do que a densidade da água (densidade = 1 g/cm³) que é o padrão para sólidos e líquidos, ou seja, o pó da droga vegetal é menos denso, portanto ocupando um maior volume (MONTANHEIRO, 1990).

A densidade aparente, expressa a relação entre a massa de material seco e o volume real ocupado por essas partículas, não incluindo o espaço ocupado pelos poros (AMARANTE, 2010; ZORZETO et al., 2014).

Este parâmetro, conforme Martins e Sacramento (2004) é importante por ser capaz de influenciar diretamente no preparo do extrato, visto que, o pó de baixa densidade necessita de uma maior quantidade de solvente durante o processo de extração para evitar a flutuação das partículas. Além disso, a densidade aparente é importante no processo de manipulação de fitoterápicos, pois constitui-se numa das exigências estabelecidas pela RDC nº 26 (ANVISA, 2014).

5.3.4 Determinação do teor de cinzas totais do material vegetal

Na avaliação do teor de cinzas totais, em triplicata, obteve-se o valor de 5,38% \pm 0,0018 (Tabela 7), estando o resultado dentro dos padrões admitidos pela Farmacopeia Brasileira 6^a. Ed. (2019). Cujo o limite máximo preconizado é de 14%, demonstrando ser um teor apropriado de material orgânico, calcinável. O percentual obtido corresponde aos constituintes minerais e organometálicos da planta ou de substâncias de origem terrosa (BRAGA et al., 2007).

O percentual observado pode corresponder a componentes minerais da própria planta (cinzas fisiológicas-intrínsecas) ou derivadas de materiais estranhos, especialmente areia e substâncias de origem terrosa aderente à superfície da droga (cinzas não fisiológicas-extrínsecas). Considerando-se, que o teor de cinzas está principalmente relacionado à presença de matéria estranha (BRAGA et al., 2007; BRASIL, 2019a).

Desta maneira, altos teores de cinzas podem indicar a presença de cinzas não fisiológicas, proveniente de tratamento inadequado na colheita, higienização e processamento do material vegetal. Já o baixo teor de cinzas totais, sugerem que

todas estas etapas (colheita, higienização e processamento da matéria-prima) foram adequadas (NAVARRO, 2009; BRASIL, 2019a).

Logo, a determinação do teor de cinzas totais de um vegetal constitui um ensaio de pureza, sendo um parâmetro, importante para o controle de qualidade do material vegetal, pois avalia a quantidade de material inorgânico não-volátil, presente na espécie (SIMÕES et al., 2010; BRASIL, 2019a).

Portanto, o resultado obtido neste trabalho, sugere a ausência de adulterantes e/ou menor contaminação do pó do *S. humboldtiana*, obtido na amostra pesquisada, tais como: substâncias inorgânicas não voláteis, correta colheita, higienização e processamento do material vegetal usado (BRASIL, 2019a).

5.3.5 Determinação do pH do material vegetal

A determinação do pH é outro parâmetro importante. O valor obtido neste teste, por meio da média e desvio-padrão das três determinações para o pH do pó do *S. humboldtiana* foi $6,12 \pm 0,36$ (Tabela 7). Valores de pH superior a 4,5 são considerados de baixa acidez. Sugerindo que o pó desta espécie contém majoritariamente substâncias ácidas (BRASIL, 2019a; FRANCO; LANDGRAF, 1996).

As substâncias de caráter ácido, encontradas nas plantas, são as mais variadas, representadas principalmente por grupos: aromáticos, terpenoides, heterocíclicos, que podem ser encontrados na forma de sais, ésteres, lactonas; nos lipídeos, na forma de essências e resinas. Uma parte destes ácidos se encontra também no estado livre, solubilizados no citoplasma (ROBBERS, 1997).

Logo, o valor de pH influencia no crescimento e na proliferação de microrganismos, na atividade enzimática, na maturação de vegetais, no emprego da temperatura em tratamentos térmicos, no uso de conservantes químicos, no controle de processos de lavagem, na escolha da embalagem na qual será acondicionado o produto, entre outros (CHAVES, 1993; CECCHI, 2003).

Dessa forma, o valor de pH é fundamental no processo de extração, pois auxilia na seleção e determinação das substâncias a serem extraídas, de acordo com suas características químicas e de polaridade. Podendo ser identificados e caracterizados, extrato vegetal, como de caráter ácido e básico, contribuindo nos parâmetros físico-químicos da droga vegetal (FRANCO e LANDGRAF, 1996; LONGHINI et al., 2007).

Portanto, plantas da família Salicaceae, tais como a espécie utilizada neste estudo, em geral vão possuir compostos químicos, majoritariamente de caráter ácido. A título, temos os compostos fenólicos, dentre eles os flavonoides, que são considerados marcadores taxonômicos desta classe, sendo alvo de inúmeros trabalhos devido à larga aplicação medicinal (BOURDY et al., 2004; OLIVEIRA, et al., 2009; FERNANDES et al., 2009).

5.3.6 Determinação do índice afrosimétrico (espuma)

O teste realizado com o pó de folhas do *S. humboldtiana* apresentou o índice de espuma negativo (0,16 cm \pm 0,06) (Tabela 7), interpretado pela altura da espuma. Em todos os tubos, a altura foi menor que um (1 cm). Representando assim, o índice de espuma inferior 100. Conforme a classificação existente na Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019). O que indica a ausência de saponinas espumídicas (CHICOUREL et al., 1998; BORELLA et al., 2006; BRASIL, 2019a).

Desse modo, a determinação do índice de espuma é realizada para verificar a presença de saponinas, substâncias que apresentam estrutura química com caráter anfifílico, em solução aquosa, formando espuma persistente, devido a parte lipofílica de sua estrutura denominada aglicona ou sapogenina e a parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares. Demonstrando ações de detergente e emulsificante, sendo assim denominada de espumídica (SCHENKEL et al., 2001; ÁLVARES, 2006).

As saponinas também podem desorganizar a membrana celular dos glóbulos vermelhos do sangue, resultando em alteração da permeabilidade e rompimento da membrana (hemólise), chamadas de saponinas hemolíticas (SUN; XIE; YE, 2009).

Além disso, os compostos saponósidos apresentam outras atividades que lhes proporcionam o emprego como adjuvantes para aumentar a absorção de medicamentos pelo aumento da solubilidade ou interferência nos mecanismos de absorção e, como adjuvante para aumentar a resposta imunológica (ÁLVARES, 2006; SCHENKEL et al., 2001).

Portanto, o índice de espuma torna-se importante, para verificar a presença de saponinas no extrato da planta que se estuda (BRASIL, 2019a; CASTEJON, 2011; ÁLVARES, 2006).

Tabela 7. Análise farmacognóstica do pó de folhas do *Salix humboldtiana*.

Parâmetros	Média (Resultado)	Limites Farmacopeia	Desvio padrão
Granulometria	Pó moderadamente grosso		
Densidade do pó	0,39 g/ml	1 g/cm ³	± 0,01
Perda por dessecação	9,75 %	8% a 14%	± 0,005
Cinzas totais	5,38 %	Máx. 14%	± 0,0018
pH	6,12		± 0,36
Índice de espuma	0,16 cm (Negativo)		± 0,06

Por fim, os parâmetros físicos e físico-químicos analisados, tais como: determinação do teor de umidade, cinzas totais, granulometria, pH, densidade e índice de espuma (ÁLVARES, 2006; BARNI et al., 2009). Em conjunto são essenciais para determinar a qualidade do insumo vegetal, consequência da complexidade de composição dele (BRASIL, 2019a). Assim, ligadas às suas condições de cultivo, coleta, armazenamento e preparo, bem como, nos tratamentos empregados para promover sua estabilidade (SOARES et al., 1998; SIMÕES et al., 2010).

5.4 RENDIMENTOS

A preparação da tintura, seguiu os parâmetros da Farmacopeia Brasileira 6ª ed. (2019) testes físicos, químicos e farmacognósticos. Foram avaliados entre os principais métodos de extração a frio, e optou-se pela tecnologia de extração do tipo (maceração exaustiva estática), que constitui uma das técnicas extrativas mais utilizadas, devido suas características e vantagens competitivas: custo reduzido, eficiência, praticidade e capacidade de extrair constituintes minoritários. Dessa forma, a preparação hidroetilica resultante da extração de drogas vegetais por maceração, utilizou tanto uma parte em massa de droga vegetal (26,60g) e quantidade suficiente do líquido extrator para produzir cinco partes em volume de tintura.

O material vegetal ficou em recipiente fechado, em temperatura ambiente por um período (7 dias), em contato com líquido extrator. Para aumentar a eficiência da extração, foi aplicado a remaceração (+ 7 dias) em que o solvente extrator foi renovado. Dessa forma, ocorreu a saturação do líquido extrator e o estabelecimento de um equilíbrio na difusão entre o meio extrator e o interior das células, este método leva o esgotamento do material vegetal (BRASIL, 2019a; RODRIGUES et al., 2016).

O solvente desempenha função principal na extração, pois quanto mais seletivo, mas é possível extrair as substâncias desejadas, também de forma direcionada se baseia-se em uso popular e na farmacopeia. Para a extração dos compostos do *S. humboldtiana*, foi necessário adequar o solvente, aos metabólitos secundários que o compõem e/ou que se deseja extrair. Para isso, o método de extração foi desenhado por planejamento, onde foram considerados as variáveis: polaridade do solvente, temperatura, tempo de extração e custo (SIMÕES et al., 2010; NAVARRO, 2009; SHARAPIN, 2000).

5.5 OBTENÇÃO DO EBSH

Após o processo de extração, a tintura foi concentrada e submetida a secagem, devido à necessidade da estabilidade física, química e microbiológica. Obtendo-se assim, o EBSH, produto (massa) sem solvente. O processo empregado, foi a evaporação do solvente em evaporador rotativo sob baixa pressão, com condições de temperatura controlada. A escolha desse método, passa por análise, como: o tipo de partícula a ser seca, o volume, tipo de solvente e a relação custo/benefício. A massa obtida foi de 26,55 g de EBSH (POMBEIRO, 2003; SIMÕES et al., 2010).

5.6 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EBSH E FRAÇÕES

A análise fitoquímica pretende caracterizar e identificar os constituintes químicos de uma espécie vegetal, ela é feita por reações químicas que resultam no surgimento de coloração e/ou precipitado característico. Assim, a pesquisa das classes de compostos presentes no EBSH foi realizada por reações colorimétricas e precipitação, para identificação de características comuns aos esqueletos de carbono dos diferentes compostos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES et al., 2010; ROSSI; SINGLETON, 1965).

A partir da análise qualitativa nos testes de screening fitoquímico preliminar do extrato do *S. humboldtiana*, foram detectados indícios da presença de seis classes de metabólitos secundários. Os resultados obtidos são mostrados abaixo no (Quadro 05).

Quadro 05 - Resultado da prospecção fitoquímica (triagem das classes de metabólitos secundários)

CLASSES DE METABÓLITOS	REAGENTES	EBSH (Resultado)	PADRÃO
SAPONINAS	Saponina Espumídica	-	Espuma estável por 30 min.
ÁCIDOS ORGÂNICOS	Reativo de Pascová	-	Descoloração do Reativo
AÇÚCARES REDUTORES	Reativo de Fehling	+	Precipitado vermelho tijolo
POLISSACARÍDEOS	Reativo de Lugol	-	Coloração azul
PROTEÍNAS E AMINOÁCIDOS	Solução de Ninhidrina	-	Coloração violeta persistente
FENÓIS E TANINOS	Cloreto Férrico	+	Mudança de coloração ou formação de precipitado
FLAVONOIDES	HCl e Mg	+	Coloração rósea a vermelha
GLICOSÍDEOS CARDÍACOS	Reativo de Kedde	-	Coloração azul ou violeta
CATEQUINAS	Solução de Vanilina	+	Vermelha intensa
SESQUITERPENOS LACTONAS	Solução de Cloridrato de Hidroxilamina	-	Coloração violeta
ALCALOIDES	Reativo de Bouchardat	-	Precipitado laranja avermelhado
	Reativo de Dragendorff	-	Precipitado vermelho tijolo
	Reativo de Mayer	-	Precipitado branco
PURINAS	HCl, H ₂ O ₂ e NH ₄ OH	-	Coloração violeta
ESTEROIDES E TRITERPENOIDES	Anidrido acético	+	Cores do azul evanescente ao verde persistente
AZULENOS	Dimetilaminobenzaldeído E Éter de petróleo	-	Coloração azul
CAROTENOIDES	Ácido Trifluoroacético	-	Cor azul
DEPSÍDEOS E DEPSIDONAS	Cloreto férrico	-	Cor verde, azul ou cinza
DER. CUMARINA	NaOH	+	Fluorescência azul
ANTRAQUINONAS	Tolueno e NH ₄ OH	-	Coloração rósea, vermelha ou violeta na fase aquosa

Os testes fitoquímicos, serviram para demonstrar a presença de classes de metabólitos secundários: açúcares redutores, fenóis e taninos, flavonoides, catequinas, esteróides e derivados de cumarina. A abordagem foi realizada a partir do EBSH, seguindo o Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica. Comparou-se os padrões para cada reação específica (BARBOSA et al., 2020).

A análise fitoquímica preliminar, mostrou resultados coincidentes com a literatura, confirmando a posição quimiotaxonômica da espécie estudada dentro da família Salicaceae. Isso porque, alguns compostos do metabolismo vegetal secundário, tendem a ser marcadores taxonômicos, devido os padrões de ocorrência, como exemplo: a presença dos salicilatos, que são glicosídeos fenólicos característicos e próprios das Salicaceae (WINK, 2003; FERNANDES et al., 2009).

Em seu trabalho, Fernandes (2009) analisou extratos de folhas do gênero *Salix*, e detectou açúcares redutores. Em outros estudos mencionam a presença de fenóis, taninos hidrolisáveis e condensados (LAKHANPAL; RAI, 2007), flavonas (DORNAS et al., 2007), flavonóis na forma de agliconas e heterosídeos (MELO et al., 2011), catequinas (PATHAK et al., 1991; RAWEL et al., 2002).

Pesquisas fitoquímicas anteriores sobre o gênero *Salix* levaram a descrição da presença de compostos fenólicos da classe dos flavonoides, que foram associados a atividades biológicas (TERRAZAS, 2017; FERNANDES et al., 2009). Historicamente o gênero *Salix* são utilizados para fins terapêuticos, sendo seu uso central no tratamento de doenças inflamatórias crônicas e agudas, como: osteoartrite, lombalgia, cefaleia, cólicas menstruais, etc. (NAHRSTEDT et al., 2007). Suas propriedades analgésica, antipirética e anti-inflamatória estão relacionadas à salicina, o principal componente bioativo do *Salix alba*, um análogo precursor do ácido acetilsalicílico (AGNOLET et al., 2012; SHARA; STOHS, 2015; FELTROW, 2000).

É sabido que os flavonoides são compostos fenólicos, que podem atuar como antioxidantes, moduladores da atividade enzimática, reguladores de respostas inflamatórias e imune do organismo humano (AGUIAR, 2010). Segundo dados experimentais, eles estão associados com a redução dos riscos de doenças cardiovasculares e até de câncer (MARCHAND, 2002). Essa diversidade de ações lhe confere uma capacidade importante no potencial farmacológico e uma alternativa promissora frente às várias doenças (TERRAZAS, 2017). Nesse sentido, o gênero *Salix* é bastante rico nesses compostos fenólicos (FERNANDES et al., 2009; NAHRSTEDT et al., 2007; EINBOND et al., 2001).

Um estudo recentemente publicado por González-Alamilla e cols. (2020), conclui que o extrato do *S. babylonica* pode ser uma alternativa para o tratamento de doenças causadas por bactérias multirresistentes. O objetivo do estudo foi caracterizar e determinar a atividade antibacteriana. A caracterização do extrato permitiu identificar: compostos fenólicos, cumarinas, lactonas, flavonóis, saponinas,

triterpenos e esteroides. Ou seja, em relação ao *S. humboldtiana*, apenas os metabólitos secundários (lactonas e saponinas) não foram similares.

Da mesma forma, a pesquisa de Kumari et al. (2016), foi demonstrado a presença de compostos fenólicos e flavonóis, corroborando com o que foi evidenciado na atual pesquisa. Além disso, o autor também observou a presença de saponinas e polissacarídeos. Esses dois últimos, ausentes nas análises referidas neste trabalho.

A disparidade entre os constituintes químicos detectados na triagem fitoquímica do EBSH e extratos de espécies do mesmo gênero, citadas na literatura podem estar relacionados a diversos fatores, considerados indutores e influentes sobre a síntese e a concentração dos metabólitos secundários em plantas (MAGALHÃES et al., 2005).

Dentre esses fatores, temos: as diferentes estruturas e partes da planta utilizadas, técnicas de processamento, extração, tipo de solventes, a localização geográfica, que afetam: a temperatura, disponibilidade hídrica, radiação U.V, nutrientes e o ciclo circadiano (GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Onde as espécies, têm que se ajustar fisiologicamente às condições ambientais, resultando em mudança na expressão dos metabólitos secundários (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Outros fatores, que exercem influência sobre a concentração de metabólitos. Diz respeito, ao modo de coleta e sazonalidade, pois expõe as plantas a mudanças periódicas. Visto que a quantidade ou até mesmo a natureza dos constituintes químicos não é constante durante o ano, o que pode explicar parcialmente a diferença entre os resultados obtidos na triagem fitoquímica do *S. humboldtiana* e os descritos na literatura de espécies do mesmo gênero (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Em síntese, os resultados encontrados através da abordagem fitoquímica, atribui a presença de compostos fenólicos como grupo de substâncias ativas de maior relevância no EBSH, em relação às outras classes. Em outros estudos, também houve a identificação desta classe de substâncias, desempenhando o papel de marcador taxonômico. Resultados que corroboram com os testes aqui apresentados (MENDEZ et al., 1995; FERNANDES et al., 2009; TERRAZAS, 2017).

5.7 FRACIONAMENTO DO EBSH

O EBSH foi fracionado por dissolução seletiva, utilizando o tratamento com solventes de polaridade crescente. Resultando na separação dos principais metabólitos secundários, contido na amostra (EBSH), de acordo com a solubilidade e afinidade com os solventes, como pode ser observado na (Figura 26).

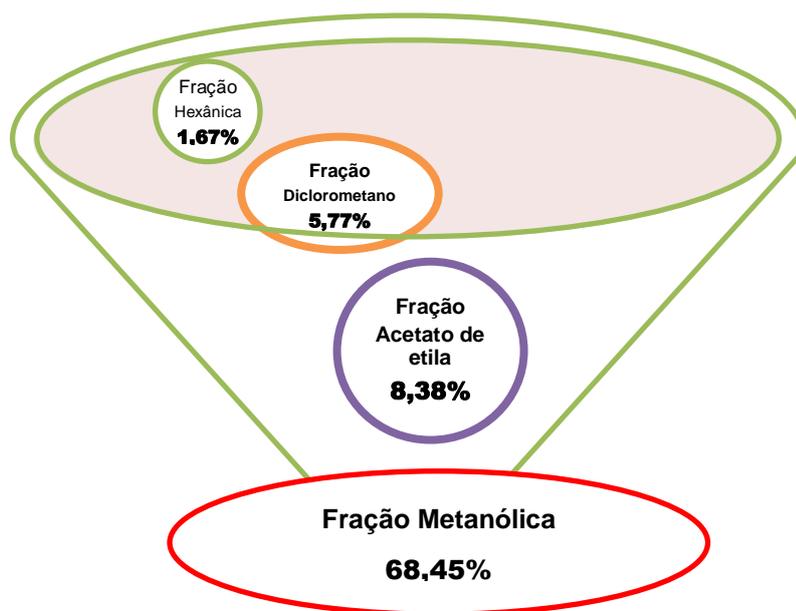


Figura 26. Fracionamento e o rendimento das frações de acordo com a polaridade crescente dos solventes orgânicos.

Devido às características físico-químicas dos solventes e dos metabólitos secundários presentes no EBSH, e suas interações químicas, as concentrações e rendimentos, resultaram em percentuais distintos, em cada fração (Figura 26) (SHARAPIN, 2000; HOSTETTMANN; QUEIROZ; VIEIRA, 2003).

De acordo com Simões (2010), o fracionamento dos extratos e os testes com as frações obtidas, possibilita, frequentemente, resultados mais claros, inequívocos e confiáveis, em razão da seletividade dos solventes. Visto que, é capaz de extrair preferencialmente as substâncias desejadas, em concentrações maiores. Pois a seletividade depende da polaridade. Assim, o conhecimento do grau de polaridade do grupo de substâncias que se deseja preferencialmente extrair, determina o tipo de solvente a ser utilizado no processo e os metabólitos (SHARAPIN, 2000).

Dessa forma, utilizou-se o metanol, como um dos solventes extratores, uma vez que é capaz de remover um amplo espectro de constituintes químicos, principalmente os mais polares. No trabalho em questão, as substâncias desejadas são os metabólitos de compostos fenólicos. Por esse motivo, utilizaram os solventes de média e alta polaridade (acetato de etila e metanol), assim como os solventes de baixa polaridade (hexano e diclorometano) (ANASTAS, WARNER, 2000; FALKENBERG et al., 2010; MOURA FILHO et al., 2017).

Assim, o fracionamento de 4,0 g do EBSH produziu: 0,22 g de fração hexânica (FHS_h); 0,26 g de fração diclorometano (FDS_h); 0,7 g de fração acetato de etila (FAS_h) e 2,51 g de fração metanólica (FMS_h). Representando respectivamente os rendimentos: 5,5 %; 6,5 %; 17,5 % e 62,8 %. Valores mostrados na (Tabela 8).

Portanto, a fração metanólica, forneceu o maior rendimento em comparação com as demais frações. Isso significa que os metabólitos secundários do extrato do *Salix humboldtiana*, em sua maioria, são de alta polaridade.

Tabela 8. Rendimento das frações hexânica (FHS_h), diclorometano (FDS_h), acetato de etila (FAS_h) e metanólica (FMS_h) do extrato do *S. humboldtiana* (EBS_h).

Frações	Massa (g)	Porcentagem (%)
FHS _h	0,22	5,50
FDS _h	0,26	6,50
FAES _h	0,70	17,50
FMS _h	2,51	62,80
Fração Insolúvel	0,31	7,70
Total	4,00	100

Outro fator, que também explica, o maior rendimento da fração preparada com metanol, corresponde ao fato do EBS_h, ser obtido por extração hidroalcoólica (etanol a 70%). Dessa forma, a amostra passou a concentrar substâncias de mais alta polaridade, e conseqüentemente tendo mais afinidade por solventes mais polares. Apontando que o preparado é rico em substâncias polares. O rendimento total do processo (92,3%) mostra a eficiência da técnica. No fracionamento, observou-se a ocorrência de material insolúvel, que foi recolhido e denominado fração residual (\pm 7,7%) (LAROZE et al., 2010; MOURA FILHO et al., 2017; ROCKENBACH et al., 2008; ANASTAS, WARNER, 2000).

5.8 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

Os compostos fenólicos abrangem um amplo grupo de moléculas que possuem em comum o anel aromático (núcleo fenólico) com uma ou mais hidroxilas, apresentando ligações conjugadas, que garante intensa absorção na luz UV, com espectro bastante característico em 254 e 350 nm ou mesmo na luz visível. O grupo também dispõe de semelhanças em reação colorimétrica e sobretudo na mobilidade cromatográfica (HARBORNE, 1984; HOSTETTMANN; HOSTETTMANN, 1989).

O resultado exibido pelo cromatograma após o preparo, utilizando a metodologia de revelação. Demonstraram um perfil de compostos fenólicos, verificado através da presença de duas bandas características: 360nm referente transição eletrônicas do anel B e 260 nm referente às transições eletrônicas do anel A (STAHL; SCHILD, 1981; SILVERSTEIN; WEBSTER, 2000).

Assim, sendo confirmados com base na comparação dos valores de Rf com o padrão e a coloração das bandas do cromatograma. Uma banda de Rf 0,81 e coloração avermelhada, na reação com vanilina, típica de compostos fenólicos e outra banda de Rf ~ 0,2 e coloração amarelada, sob o mesmo tratamento, característica de flavonoides. A banda de Rf ~ 0,81 possui Rf da catequina; A banda de Rf ~ 0,2 possui Rf de comportamento da rutina frente ao reagente de deslocamento (WAGNER; BLAT, 2001; SOUSA, 2015).

Todavia, no cromatograma revelado com reagente DPPH, foi observada na fração FAESh1 uma banda com Rf ~ 0,81, sugestivo de catequina e outra banda com Rf ~ 0,52, observada também sob luz UV (254 nm), característica de glicosídeos fenólicos (WAGNER; BLAT, 2001).

Tabela 9. Análise dos Compostos fenólicos em CCD.

Rf	Tratamento	Coloração	Flavonoides
~ 0,81	Reação com Vanilina	Avermelhada	Compostos fenólicos (Catequina)
~ 0,2	Reação com Vanilina	Amarelada	Flavonoides (Rutina)
~ 0,52	DPPH		Salicina
~ 0,81	DPPH		Catequina

Nas principais pesquisas fitoquímicas relacionadas a espécies do gênero *Salix*, como por exemplo: *Salix daphnoides*, *Salix pentadra*, *Salix purpurea*, *S. alba* e *Salix fragilis*. Houveram estudos dos constituintes químicos (metabólitos secundários) e a identificação dos compostos fenólicos como grupo predominante (majoritário), marca conhecida desse gênero (BARNES, 2001).

Em estudos como de Fernandes e colaboradores (2009), foi caracterizada nas folhas e talos do *Salix martiana* a existência de salicina, utilizando a cromatografia em camada delgada. Mostrando que o extrato metanólico do *S. martiana* apresentava alto teor de compostos fenólicos da classe dos flavonoides, correspondendo tanto em ensaios quantitativos quanto qualitativos utilizando o DPPH (KUMARI et al, 2016).

Em extratos aquoso e etanólico de folhas e cascas do *Salix aegyptiaca*, indicou a presença dos compostos fenólicos, sendo constatado quantidades expressivas de catequina e rutina, além da presença de glicosídeos fenólicos, como exemplos: acilsaligenina, salicina e salicortina, resultado similar ao trabalho em questão com o *Salix humboldtiana* (ENAYAT; BANERJEE, 2009).

5.9 ANÁLISE POR CLAE-DAD DO EBSH E FRAÇÕES

A Cromatografia Líquida de Alta Eficiência vem se destacando, há algum tempo, como um método analítico, amplamente empregado nas análises quantitativas, devido a possibilidade de separar os constituintes e de forma simultânea quantificá-los: rapidez, praticidade e confiabilidade. Sendo uma técnica bastante usada para determinar derivados da classe dos salicilatos (FONSECA, 2002; PORTO, 2014; PAVIA; LAMPMAN; KRIZ, 1996; RAKESH et al., 2015).

Dessa forma, o extrato bruto hidroetílico, obtido das folhas do *Salix humboldtiana* e suas frações foram submetidos à análise por CLAE-DAD em modo gradiente, com intuito de separar os componentes da amostra e caracterizá-los com relação às suas polaridades.

Os cromatogramas foram registrados por detecção sob luz U.V nos comprimentos de onda: 230, 275 e 365 nm. Logo, os cromatogramas obtidos, sugerem a presença de compostos de diferentes polaridades, com substâncias de variadas constituições. Esse resultado se deve, em razão pelo qual o extrato bruto e suas frações, apresentarem matrizes altamente complexas, com inúmeros constituintes do metabolismo secundário vegetal.

Contudo, os glicosídeos fenólicos, são os constituintes predominantes no gênero *Salix*, eles apresentam propriedades relevantes do ponto de vista farmacológico, com diversos benefícios à saúde humana, com destaque para atividades antipirética e anti-inflamatória, como é o caso da salicina, o que os tornam de interesse para a indústria farmacêutica (FERNANDES et al., 2009; RAKESH et al., 2015). Também dispõem de características: reativos, instáveis e facilmente oxidáveis, assim acabam assumindo atividade antioxidante atribuída (BARNES et al, 2001; SALVADOR; HENRIQUES, 2004).

Além das propriedades antioxidantes, eles podem apresentar função pró-oxidativa dependendo da concentração em que são utilizadas. Portanto as mesmas

características que favorecem a proteção contra doenças, podem influenciar para o estresse oxidativo, causando danos ao organismo humano (ZAITER et al., 2016; STAHL; SCHILD, 1981).

Logo, as propriedades citadas anteriormente, se devem: a sua estrutura química, a sua capacidade de inibir a COX, além das suas propriedades redutoras que neutralizam os radicais livres, quelam os metais e decompõem o oxigênio em peróxidos (STAHL; SCHILD, 1981; SALVADOR; HENRIQUES, 2004; YU et al., 2002; MAHDI; MAHDI; BOWEN, 2006).

Por esse e entre outros motivos, é crucial conhecer a estrutura química dos constituintes do metabolismo secundário vegetal, através de técnicas de identificação e quantificação, como é o caso da CLAE-DAD, considerada uma técnica consistente, confiável e segura (FERNANDES et al., 2009; PORTO, 2014; RIBEIRO, 1999; RAKESH et al., 2015). Sendo bastante adequada na determinação e quantificação dos derivados de compostos fenólicos, assim como para a classe dos salicilatos, a exemplo: salicina, salicortina, populina, fragilina, todos esses, constituintes químicos naturais das espécies do gênero *Salix* (KRAUZE; SZUMOWICZ, 2004; POHJAMO et al., 2003; JAN et al., 2013; MARQUETE; TORRES; MEDEIROS, 2015; SHARMA et al., 2011; NAHRSTEDT et al., 2007).

Na imagem (Figura 27) é exemplificado uma estrutura padrão do flavonoide. Com o pico em 356 nm pode estar relacionado com a banda I (anel B, porção cinamoil), enquanto que o pico em 256 é sugestivo da banda II (anel A, porção benzoil) (SIMÕES et al., 2013; SILVA et al., 2010; MANACH et al., 2004; BEECHER, 2003; ANGELO & JORGE, 2007).

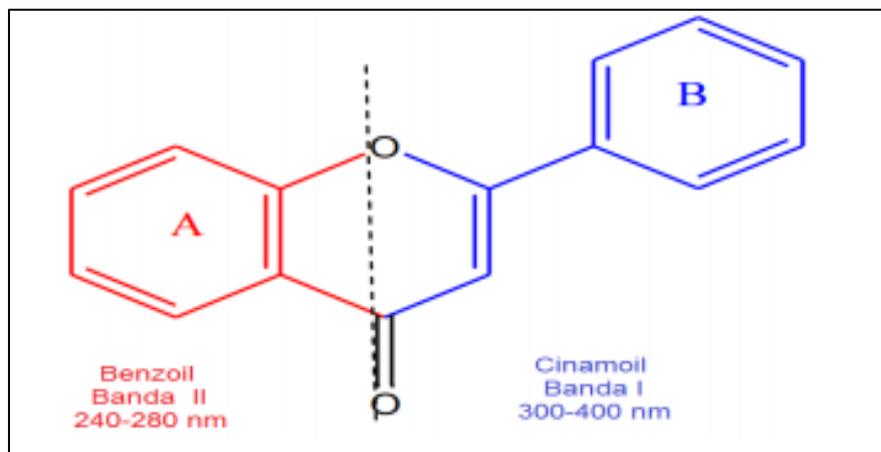


Figura 27. Estrutura química flavonoide com as bandas de absorção no UV.
Fonte: MANACH et al., 2004.

No trabalho em questão, a identificação do extrato e frações do *S. humboldtiana*. O pico 1 (Figura 28) ($R_t=7,22$ min) mostra um espectro Uv-vis. referente a catequina no $\lambda_{m\acute{a}x} = 280$ nm. Por sobreposição dos cromatogramas, o padrão de catequina e a amostra, seus tempos de retenção análogos.

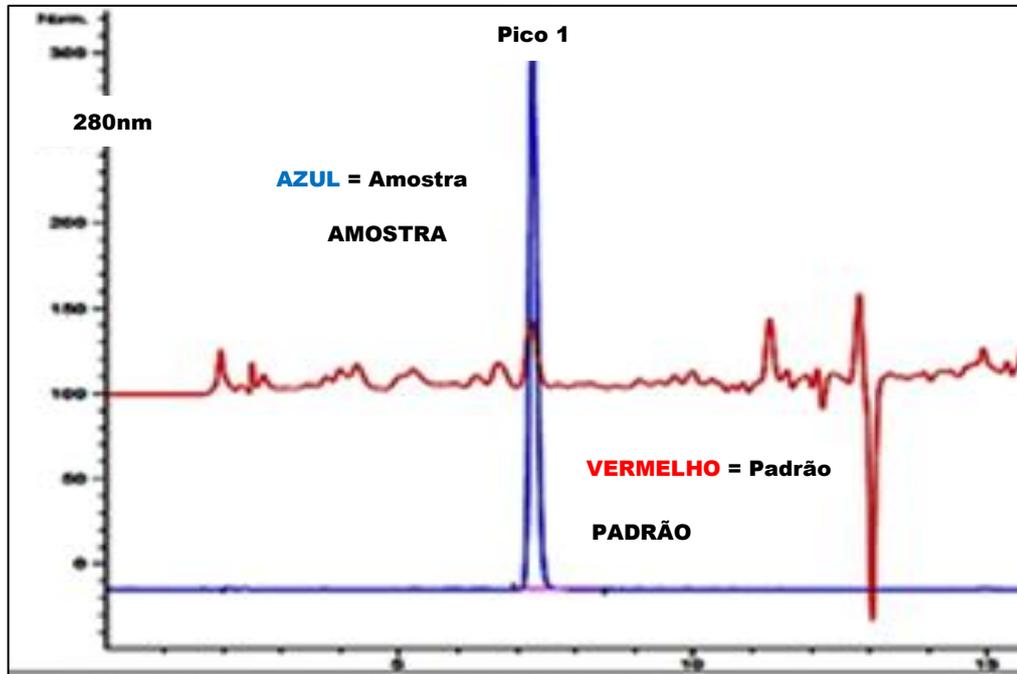


Figura 28. Pico 1 - Sobreposição de cromatogramas obtidos por CLAE-DAD. EBSH (vermelho) e substância referência catequina (azul), detecção no comprimento de onda de 280 nm (espectro).

A identificação dos compostos fenólicos (flavonoides) foi realizada por comparação da similaridade entre os tempos de retenção dos perfis cromatográficos e os espectros de absorção UV/VIS de padrões autênticos. Foram avaliados os sinais cromatográficos e seus espectros obtidos de 220 a 400 nm, conforme apresentado na (Tabela 10). A identificação das substâncias, utilizou como base de dados a biblioteca de padrões presente no equipamento.

Flavonoides possuem características espectrais no UV/VIS apresentando o máximo de absorção entre 340 e 370 nm (ARAPITSAS, 2008). Desta forma, com os dados obtidos a partir da análise por CLAE/DAD, pode ser observado a presença de flavonoides no extrato analisado e nas frações. Os picos com características espectrais semelhantes a flavonoides, foram comparados com os padrões, para identificação e quantificação dos mesmos.

Tabela 10. Padrões e tempo de retenção das amostras analisadas em CLAE-DAD.

Padrões	Tempo de Retenção	Máximo de Absorção (λ Lambida)	Área
RUTINA	29,140	256,354	8732052
QUERCETINA	47,740	255,371	34584536

Fonte: Adaptado de RAKESH et al., 2015.

Para o extrato foi observado picos de substâncias, sendo possível identificar uma delas, rutina (TR 29,14), conforme demonstrado na (Figura 28). Além disso, os picos em 25,19 min e 33,40 min são flavonoides. Derivados da quercetina e salicilatos.

O pico 1 (Figura 28) trata-se de um análogo de rutina, a diferenciação nas estruturas químicas dos flavonoides é basicamente a posição e o tipo de açúcar (carbono 3 do núcleo do flavonoide). Assim, a rutina possui um dissacarídeo (raminose + glicose) conectado a posição C-3 do flavonoide (PEDRIALI, 2005; THEUNIS et al., 2004). A rutina apresenta uma importante atividade antioxidante, semelhante aos resultados no qual caracterizou os compostos presentes no extrato das folhas do *Salix alba* (RAKESH et al., 2015; FERNANDES, 2009).

O pico 1 (Rt =29,14 min) mostra um espectro uv-vis (Figura 29) como mostra a figura A (banda I de $\lambda_{\text{máx}} = 322$ nm e banda II de $\lambda_{\text{máx}} = 245$ nm), característico dos flavonoides, neste caso sugestivo de rutina. Os espectros exibem 02 picos de absorção máxima entre 240 e 380 nm. Esses picos são comuns como banda I (300-380nm) e banda II (240-280nm) (MERKEN; BEECHER, 2000).

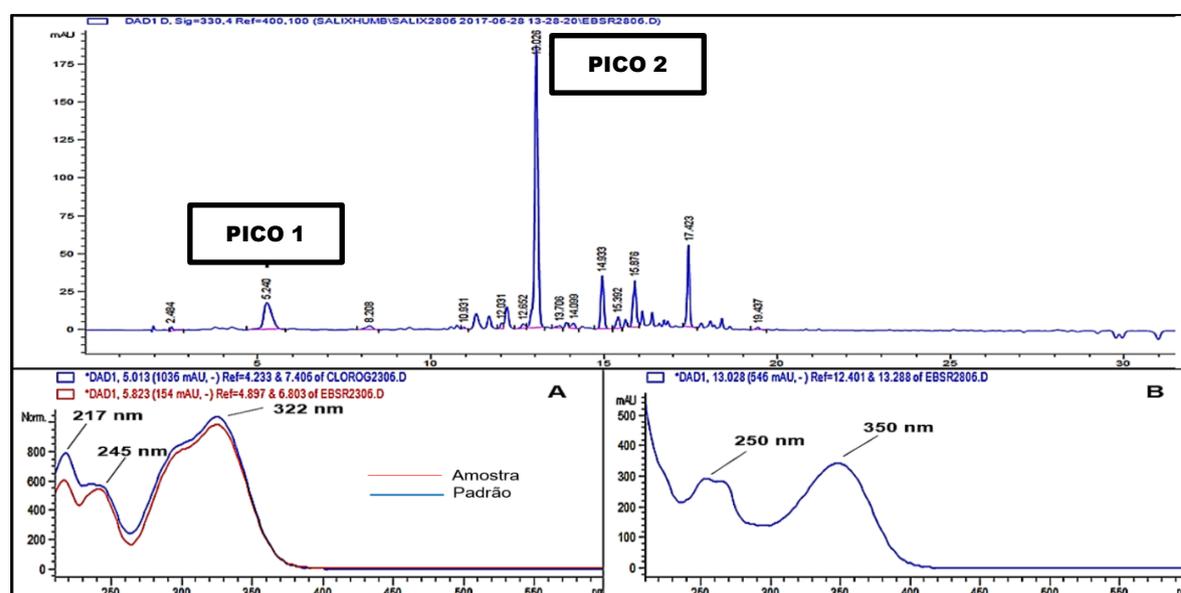


Figura 29. Perfil cromatográfico do EBHSh obtido por CLAE-DAD com detecção no comprimento de onda de 330nm. Pico 1' e Pico 2' com seus respectivos espectros A e B.

O pico 2 (Rt= 18,30 min), exibem espectros no UV-vis (Figura 29), como mostra a figura B (banda I de $\lambda_{\text{máx}} = 350$ nm e banda II de $\lambda_{\text{máx}} = 250$ nm) que são semelhantes aos os achados onde salicilatos, tipo glicosídeos fenólicos, apresentam espectros de bandas de absorbância, cerca de 215-220 nm (240 nm para salicilol-salicina) e um mais fraco a 270 nm (ABREU et al., 2011)

Estudos sobre os constituintes de diferentes partes das plantas de espécies do gênero *Salix*, sobretudo: folhas e caule, revelaram alto teor de compostos fenólicos, apresentando especialmente como uma das principais substâncias identificadas e quantificadas: apigenina, miricetina, quercetina e outros derivados salicilatos (RAKESH et al., 2015; PEDRIALI, 2005; FERNANDES, 2009).

Nos bioensaios, utilizando modelos *in vivo*, os extratos de folhas do *S. aegyptiaca* mostraram efeitos anti-inflamatórios em edema de pata induzido por carragenina (RABBANI et al., 2010). Isso vem acrescentar e corroborar no destaque da atividade anti-inflamatória e anti-edematogênica, apresentado nessa pesquisa, quando no qual a dose testada de 500mg do EBSH, apresentou redução do edema peritoneal em zebrafish, no tempo de 5h.

Portanto, o levantamento do perfil químico de plantas, permite caracterizar as substâncias constituintes e seus principais grupos estruturais. Dessa forma, o desenvolvimento de um perfil de marcador como padronização é de grande importância para o controle de qualidade e validação científica. Sobretudo na quantificação e identificação de compostos de interesse para a farmacologia.

As frações forneceram resultados não totalmente conclusivos, demandam mais experimentos para elucidação.

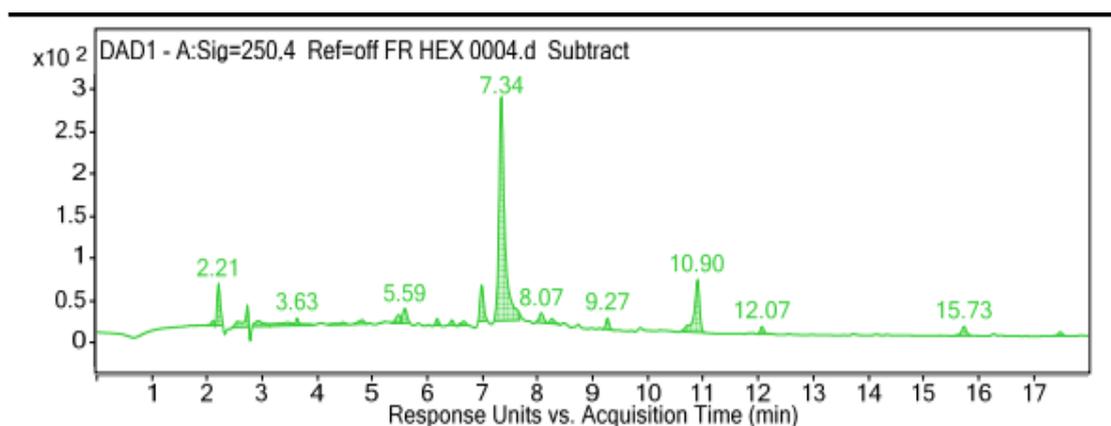


Figura 30: Cromatograma da fração Hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 250 nm.

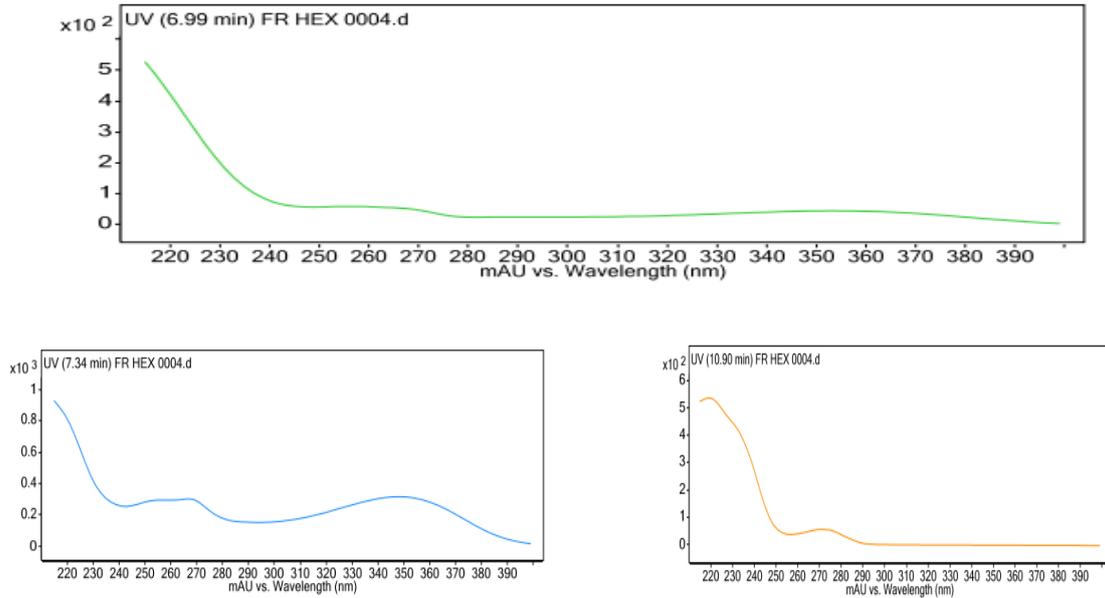


Figura 31. Espectro nos diferentes tempos de retenção da fração Hexânica (FHS), Detecção no comprimento de onda 250 nm.

User Chromatograms

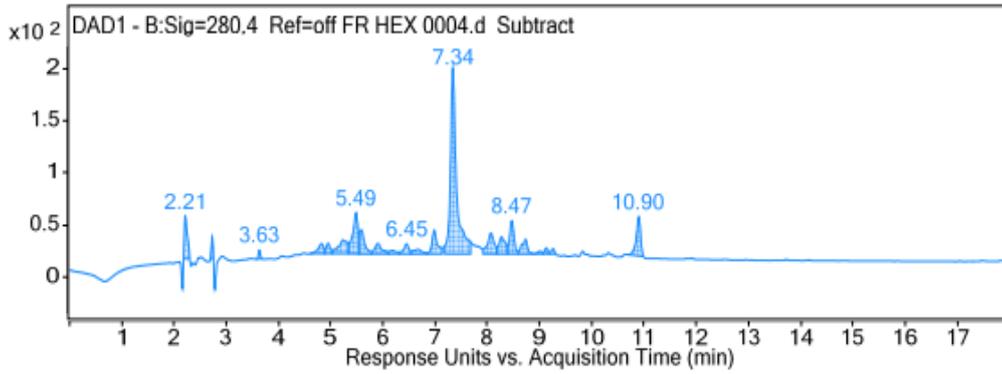


Figura 32. Cromatograma da fração Hexânica (FHS_n), Detecção no comprimento de onda 280 nm.

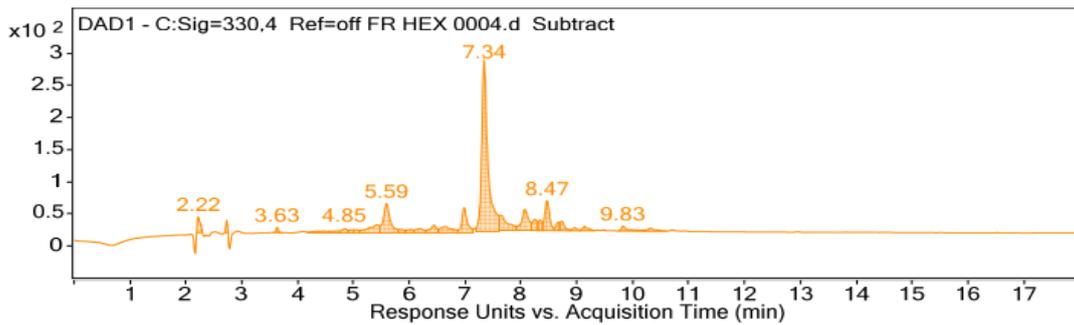


Figura 33. Cromatograma da fração Hexânica (FHS_n), Detecção no comprimento de onda 330 nm.

5.10 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EBSH EM MODELO ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

5.10.1 Animais usados nos bioensaios

Para avaliação da atividade anti-inflamatória do EBSH, foram utilizados para os testes *in vivo*, animais com aspectos e características específicas para a demanda necessária neste bioensaio, tais como: garantia de origem, controle sanitário, representando maior segurança, qualidade dos animais e menor risco.

Na etapa de avaliação de atividade biológica, é mais relevante e compatível para análise e testes farmacológicos relacionados ao processo inflamatório (edema) o uso de animais (adultos). No gênero foram utilizados animais de ambos os sexos para servir de comparação e padrão; no aspecto de tamanho e peso, foram variados, para facilidade de manutenção, manuseio, custo e utilização (SOUZA et al., 2016; BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2017; BRUNDO; SALVAGGIO, 2018).

Dessa forma, a espécie *Danio rerio*, conhecida como “zebrafish” preencheu todos os requisitos de escolha como organismo-modelo, em detrimento de outros animais, devido inúmeras vantagens (BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2017).

5.10.2 Bioensaios em zebrafish (*Danio rerio*)

Os ensaios *in vivo*, utilizando “Organismo-modelo” zebrafish (*Danio rerio*) foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa no Uso Animal da Universidade Federal do Pará (UFPA), pelo Certificado de Apresentação para Apreciação Ética: 35524920.5.0000.0018, número do Parecer: 4.210.040 (ANEXO I).

5.10.3 Grupos de tratamento

O ensaio para avaliação da atividade anti-inflamatória, foram randomizados e controlados. O delineamento e investigação partiu da causa em direção ao efeito, as substâncias utilizadas foram codificadas, sendo administradas: Indometacina, solução salina (PBS), extrato (EBSH) e carragenina a 1% (BORGES et al., 2018; CARVALHO et al., 2017). Foram 8 grupos de tratamento, com 7 animais cada, totalizando 56 peixes adultos de ambos os sexos, tamanho médio 2 ± 5 cm e peso $0,2 \pm 1,0$ g.

Tabela 11. Grupos de tratamentos

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV	Grupo V	Grupo VI	Grupo VII	Grupo VIII
Controle Positivo	Controle Negativo	Branco	75 mg	150 mg	300 mg	500 mg	750 mg
Nº 7/grupo de acordo com peso							

5.10.4 Vias de administração (gavagem e injeção intraperitoneal)

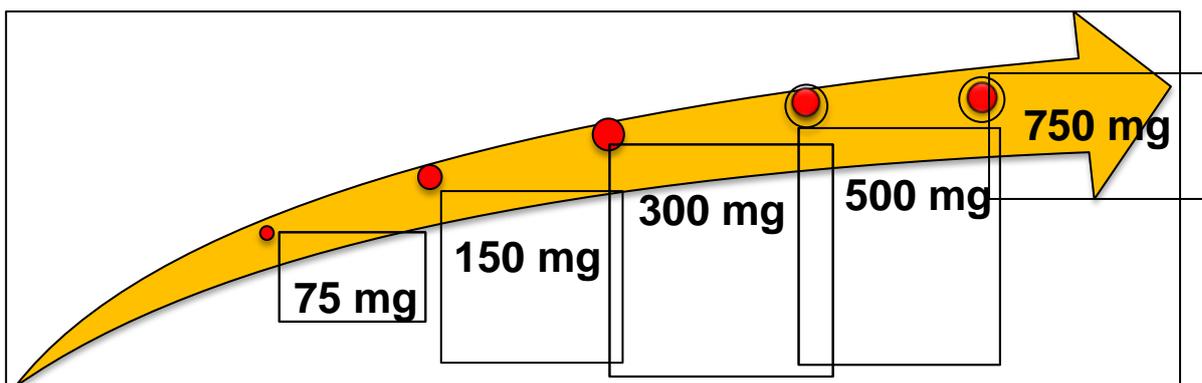


Figura 34. Esquema das concentrações do (EBSH) do *Salix humboldtiana*.

Nos ensaios na plataforma zebrafish, não foram registrados acontecimentos com eventos adversos severos, tais como: danos, traumas, lesões ou morte iminente de animais, decorrentes unicamente da administração, tanto por gavagem ou por injeção intra-abdominal (Intraperitoneal).

Contudo, são necessários alguns cuidados para prevenir e reduzir danos, eventos adversos, lesões e até a morte dos animais, relativo a administração de substâncias testes (NUNES, et al., 2009; KINKEL et al., 2010). A probabilidade de infecções, riscos de traumas, extravasamentos, ruptura do TGI, entre outros. São inerentes e ao mesmo tempo completamente evitáveis (COLLYMORE et al., 2013; PRINCE; ANDERSON; DALGIN, 2016; SOUSA, et al., 2004; BOVINO, 2016).

Durante o procedimento de administração oral por gavagem, os peixes receberam os cuidados necessários, com a introdução da pipeta com o máximo de 1 cm de profundidade, tendo atenção na obstrução caso ofereça resistência, essa sensibilidade foi crucial para não ocorrer traumas e rompimento do trato digestivo, sempre foi interrompido quando tal dificuldade surgiu (COLLYMORE et al., 2013; BORGES, 2018; DANG et al., 2016).

No entanto, na administração via parenteral, ocorreu apenas a hiperemia, alteração comum, devido à perfusão tecidual pelo bisel da agulha (KINKEL et al., 2010). Esse sinal foi observado em todos os grupos que receberam as injeções, consiste no aumento da quantidade de sangue circulante no local e estar associada a ruptura de vasos e microvasos com presença de pequenos sangramentos (CARVALHO et al., 2017; LORAM, 2007; SALVEMINI, 1996; NORONHA, 1990).

Em conjunto, essas minúcias reproduzem a somatória de elementos para a correta administração de injeções e gavagem em animais de laboratório e a efetividade dos testes em bioensaios (COLLYMORE et al., 2013).

5.10.5 Indução da inflamação, mensuração do edema e avaliação do efeito do EBSH em modelo zebrafish (*D. rerio*)

Neste bioensaio a resposta do EBSH, foi testada e analisada quanto à sua provável propriedade anti-inflamatória e capacidade anti-edematogênica, utilizando o modelo zebrafish (*D. rerio*). Foram utilizados no experimento: indometacina como fármaco padrão; solução de carragenina em tampão PBS a 1%, como agente flogístico desencadeador da inflamação (induz o edema); controle negativo administrados somente com solução fisiológica 0,9% e o EBSH, sendo avaliado em diferentes concentrações (75 mg, 150 mg, 300 mg, 500 mg e 750 mg). Dessa forma, apresentou-se respostas distintas na redução do edema durante o tratamento, em um tempo de até 5 horas.

A medida do edema foi realizada por pesagem dos animais no início e no fim do experimento. Logo, a formação do edema e sua inibição foram avaliadas por variação do volume e do peso do animal. O cálculo foi realizado através da diferença entre os valores do peso inicial antes da aplicação da carragenina (tempo zero) e o peso após a injeção (tempo 5 h) após a evolução do edema (SILVA, 2016; BATISTA et al., 2016; MAGALHÃES et al., 2017).

Na literatura científica internacional, não há muitas publicações a respeito do edema induzido por carragenina em *D. rerio* (zebrafish), pelo fato de ser um modelo experimental novo e em fase de aprimoramento e padronização do método. Dessa forma, o presente trabalho representou uma perspectiva inovadora, sobretudo no contexto da avaliação e dos efeitos de compostos da classe dos glicosídeos fenólicos

encontrados na espécie *S. humboldtiana* através do EBSH, juntamente com os estudos e ensaios em modelo *in vivo* utilizando o zebrafish.

Entre as cinco diferentes concentrações do EBSH testados e avaliados no modelo zebrafish, a concentração de 500 mg, forneceu resposta estatisticamente mais expressiva quanto à atividade anti-inflamatória e grau anti-edematogênico após 5 h de tratamento. Essa resposta foi superior ao padrão indometacina se comparados ao controle negativo, indicando dessa forma a capacidade de redução e/ou inibição do edema na região peritoneal.

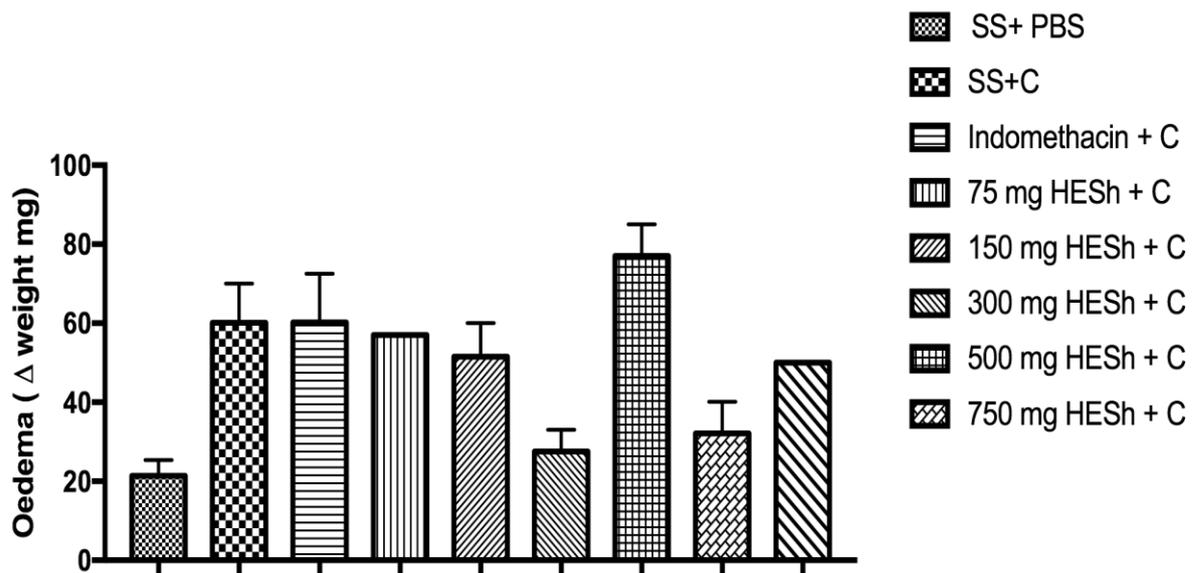


Figura 35. Efeito do tratamento oral com solução salina + PBS ip, Tween 80 (controle negativo), Indometacina (25 mg / kg) EBSH (75.150.300.500.750/ kg), no edema induzido por carragenina (20 µg, ip) em peixe-zebra (*D. rerio*). Os dados são apresentados como média ± SEM (n = 5 / grupo), * p <0,05 vs. grupo controle negativo; a análise estatística foi realizada pelo teste ANOVA de uma via e, em seguida, seguido pelo Tukey post-hoc.

Portanto, vale ressaltar que a resposta inflamatória em modelo zebrafish, induz sinais e sintomas típicos da inflamação como o inchaço, logo estas referências são comuns nos outros modelos, como o edema de pata em roedores. Assim, o modelo zebrafish pode contribuir da mesma forma como os modelos tradicionais, sendo uma alternativa a mais, um modelo *in vivo* de *screening* de drogas com todo um conjunto de vantagens competitivas e que apresenta agilidade no processo de pesquisa.

Os grupos previamente tratados com EBSH 75 mg / kg apresentaram inibição de 5%; 150 mg / kg apresentaram inibição de 14%; 300 mg / kg apresentaram inibição de 54%; 500 mg / kg apresentaram inibição de 60%, 750 mg / kg apresentaram inibição de 43% de edema abdominal em comparação ao controle negativo. Não houve diferença estatisticamente significativa.

5.10.6 Avaliação dos parâmetros comportamentais de zebrafish após exposição aos testes (EBSH)

Os modelos animais são espécies que são utilizadas em avaliações de efeitos biológicos e comportamentais, produzindo resultados que podem ser duplicados aos seres humanos. Além disso, a escolha de um modelo animal deve levar em consideração aspectos como: padronização, repetibilidade e precisão de respostas avaliadas. A uniformidade dos organismos é uma condição importante para realização da pesquisa científica, a fim de obter respostas com maior exatidão e mais clareza em relação às variáveis (BITTENCOURT, 2018; CHAULET, 2018, SAMPAIO, 2018).

Desta forma, os ensaios realizados na plataforma zebrafish, por meio da administração do EBSH em diferentes concentrações, analisou os parâmetros comportamentais através da observação visual, registrando e relacionando o comportamento observado ao modelo de padrão comportamental (Etograma do *D. rerio*) (Quadro 06). Logo, as vantagens do uso do *D. rerio* em pesquisas, está na resposta comportamental bem definida, robusta e mensuráveis, evidenciada no seu padrão comportamental predeterminado (BITTENCOURT, 2018; KALUEFF et al., 2013; RIBEIRO, 2013; BRITO, 2018; SAMPAIO, 2018; SASZIK; SMITH, 2018).

A exposição do *D. rerio* as diferentes concentrações do EBSH nos testes para avaliação da atividade anti-inflamatória, assim como (Indometacina e carragenina), desencadearam significativas alterações comportamentais nos peixes.

Tais alterações comportamentais, foram classificadas em três categorias (Quadro 06) e em quatro estágios: I, II, III e IV (Tabela 12), de acordo com a resposta a estímulos e estresse: agitação com respiração superficial; excitação motora e movimentação no aquário; tipo de deslocamento e postura; padrão de posição no aquário, inclusive a perda da força muscular, motilidade e até a morte (BITTENCOURT, 2018; KALUEFF et al., 2013; RIBEIRO, 2013).

Além desses, foram levados em consideração para avaliação outros critérios: o tipo de grupo exposto, duração do experimento e a quantidade de observações realizadas (Tabela 12). O comportamento dos animais foi avaliado por um observador humano, a cada uma hora, por dois minutos de duração, sendo registrado as observações, tendo o último registro 5 horas após a administração oral do EBSH.

Quadro 06 - Etograma comportamental de zebrafish (*Danio rerio*).

Categoria	Evento	Siglas	Descrição
Locomoção/ Movimento	Nadar lento	NL	O animal movimentava sua nadadeira caudal lentamente, de modo que seu deslocamento ocorra normalmente.
	Nadar rápido	NR	O animal movimentava sua nadadeira caudal rapidamente, de modo que se deslocasse rapidamente no corpo d'água.
	Flutuar	FL	O animal mantém-se sem movimento, flutuando com as nadadeiras laterais fechadas.
	Descansar	DE	Os animais mantêm-se sem movimento, no substrato, com as nadadeiras laterais fechadas.
	Natação Inclinada	NI	Natação em ângulo diferente de 90° em relação às superfícies d'água.
	Natação Circular	NC	Natação em movimento circular.
Respiração Superficial e Alteração Motora	Respiração Superficial Aérea	RS	O animal utiliza respiração aérea, mesmo sob condições de aeração.
	Contração Muscular	CM	O animal apresenta espasmo e tremores, principalmente na cauda.
	Fraqueza Muscular	FM	O animal apresenta atonia muscular, perda da motilidade.
Padrão de Posição no aquário	Posição na Superfície	PS	O animal mantém-se próximo à lâmina d'água, sem movimentos ou lento.
	Posição no Fundo	PF	O animal mantém-se no substrato, sem movimento ou com movimento lento.

Fonte: Kalueff et al. (2013) e Altmann, 1974 (Adaptado).

Os animais submetidos aos ensaios com EBSH apresentaram alterações no comportamento normal em todas as doses testadas, essas alterações variaram de acordo com a concentração do EBSH administradas. Nas três menores doses (75 mg, 150 mg e 300 mg), os peixes apenas manifestaram alterações leves à moderadas e em menor frequência, enquanto nas duas concentrações maiores (500 mg e 750 mg), eles manifestaram importantes alterações comportamentais, algumas com maior frequência e intensidade.

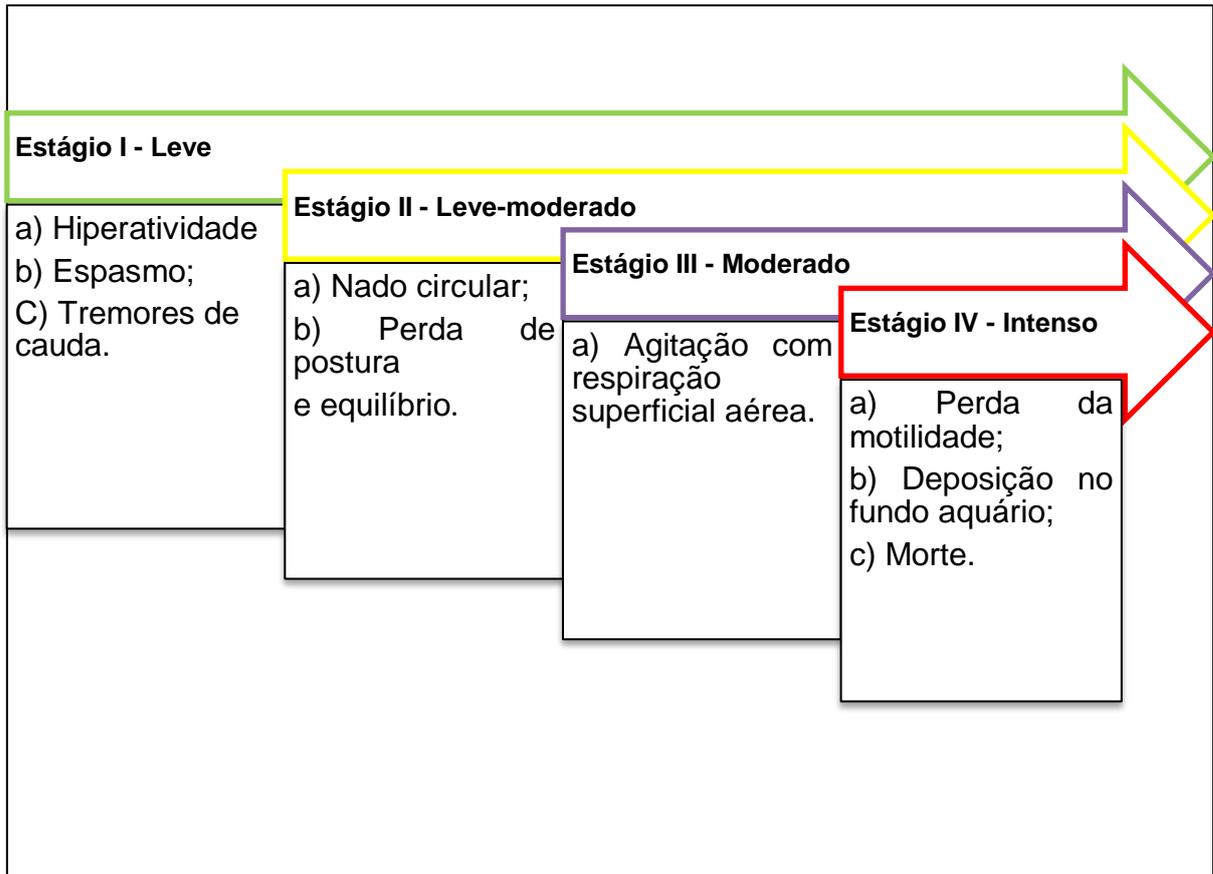


Figura 36. Estágios comportamentais zebrafish. Fonte: BRITO, 2018, com adaptações.

Desse modo, os eventos comportamentais iniciaram com o aumento da excitabilidade e agitação motora do animal, culminando com a perda da postura e motilidade; o aumento da excitabilidade do animal é representado pelo aumento da atividade de natação; já perda da postura é representado pela falta de equilíbrio e movimento (SOUZA et al., 2016).

Além desses dois comportamentos extremos, também foram observadas outras sete reações de alterações no parâmetro comportamental do zebrafish. Eles são importantes indicadores de estresse e ao mesmo tempo uma resposta adaptativa ao meio, que pode ser causado por substâncias exógenas (xenobiótico), muitas vezes doses tóxicas ao animal (RIBEIRO, 2013; BRITO, 2018; SANTOS, 2016; SASZIK; SMITH, 2018).

Na dose de menor concentração do EBSH (75 mg) as alterações comportamentais observadas foram principalmente o aumento na atividade de nado e movimentação, nos primeiros minutos e hora, além de leves e raros tremores no eixo da cauda e pequenos espasmos (contração muscular).

A respiração superficial aérea, manifestação nítida de sinal de estresse, foram observados principalmente nas concentrações (150 mg e 300 mg), juntamente com o nado circular, perda de equilíbrio e postura. Nesses dois grupos, assim como nos outros, os minutos iniciais foram retratados por visualizações no aumento da atividade de nado (hiperatividade natatória).

Já na concentração de 500 mg houve observação importante no padrão de redução da motilidade, perda da postura assim como deposição no fundo. A hiperatividade e movimentação, também marcou nos primeiros instantes, assim como nas outras dosagens do EBSH.

Na concentração mais elevada do EBSH (750mg) as alterações comportamentais observadas foram mais severas, abrangendo praticamente todos os eventos comportamentais: iniciando com o aumento na atividade de nado, tremores no eixo da cauda, espasmo, acompanhado pela redução da motilidade, perda de postura e conseqüentemente a deposição do animal no fundo do aquário e por fim a interrupção dos movimentos operculares caracterizando assim a mortes (BRITO, 2018; SOUZA, 2015, SANTOS, 2016; SAMPAIO, 2018).

De acordo com Bittencourt (2018), em ensaios *in vivo* é comum ocorrer estresse nos animais, sobretudo no preparo e manuseio dos mesmos, como por exemplo na administração de substâncias teste, etc. podendo gerar alterações no comportamento normal e alterações nas diversas funções fisiológicas. Portanto, alguns desses fatores são normalmente avaliados e quantificados para ser levado em consideração na pesquisa (FARIAS, 2018; BRITO, 2018; SAMPAIO, 2018).

Segundo Ribeiro (2013) a exposição do peixe a uma situação de estresse, desencadeia o seu primeiro mecanismo de defesa, que na maioria das vezes, é o comportamento de fuga (aumento da atividade de nado), na tentativa de diminuir a probabilidade de morte, ou então, pode ocorrer um comportamento de economia do gasto metabólico e energia para manter a homeostasia fisiológica (SCHRECK et al., 1997; SAMPAIO, 2018; SASZIK; SMITH, 2018).

Tabela 12. Avaliação das alterações comportamentais do *D. rerio* diante das diferentes concentrações do EBSH testadas e os variados intervalos observados (horas).

Estágios	Tempo duração	75 mg	150 mg	300 mg	500 mg	750 mg	Positivo Indometacina
Estágio I	0' h	1,2	1,3	1,2	1,2,3	1,2,3	
Estágio II	0' h			1,2	2	2	
Estágio III	0' h		3				
Estágio IV	0' h						
Estágio I	1 h	1	1	1,2	1,2,3	1,2,3	
Estágio II	1 h			1,2	1	1,2	
Estágio III	1 h						
Estágio IV	1 h			1,2,3	1,2,3	1,3	
Estágio I	2 h		1	1	1	1,2	
Estágio II	2 h			2	2	1,2	
Estágio III	2 h					1	
Estágio IV	2 h		1,2,3	1,2	1,3	1,2,3	
Estágio I	3 h				1	1	
Estágio II	3 h				2	2	
Estágio III	3 h						
Estágio IV	3 h			1,2,3	1	1,3	
Estágio I	4 h				1		
Estágio II	4 h					2	
Estágio III	4 h				1	1	
Estágio IV	4 h				1,2	1,2,3	
Estágio I	5 h						
Estágio II	5 h				2	2	
Estágio III	5 h						
Estágio IV	5 h					1,2,3	

Estágio I: 1) Aumento na atividade de nado, 2) Espasmos e 3) Tremores no eixo da cauda; Estágio II: 1) Nado circular e 2) Perda da postura; Estágio III: 1) Agitação com respiração superficial aérea; Estágio IV: 1) Perda da motilidade, 2) Deposição do animal no fundo do aquário e 3) Morte. Fonte: adaptado de RIBEIRO, 2013; BRITO, 2018; SOUZA, 2015, SANTOS, 2016.

Analisando a evolução do experimento foi possível observar que os animais apresentaram um padrão comportamental que se mostrou semelhante entre a maioria dos grupos, sofrendo flexíveis e sequenciais alterações no decorrer do experimento. Podemos notar que a maior parte dos animais ficam entre os estágios I e II, apresentando diferença apenas no tempo em que levam para apresentar tais comportamentos. Também observou que as altas concentrações (500 mg e 750 mg) causaram significativas alterações comportamentais nesses organismos, sobretudo no estágio IV que culminaram na perda da motilidade, deposição no fundo do aquário e na morte dos animais.

5.10.7 Monitoramento da mortalidade e Eutanásia

A mortalidade foi monitorada continuamente, e os peixes foram considerados mortos quando o movimento do opérculo e resposta a estímulos mecânicos já não puderam ser observados (WILSON; BUNTE; CARTY, 2009).

A eutanásia foi utilizada com o intuito de causar a morte rápida dos animais com o mínimo de dor e sofrimento possíveis, sendo mantido o bem-estar dentro da sua zona de conforto. Existem duas categorias de métodos que podem ser utilizados para eutanásia de zebrafish: Imersão em solução com anestésico e o método físico (decapitação, secção da medula e choque térmico) (MATTHEWS; VARGA, 2012; AVMA, 2013).

Após o término do experimento, os peixes restantes foram rapidamente eutanasiados por imersão em solução de gelo com água na proporção de 4:1, entre 2°C a 4 °C, ou seja, o método de escolha foi o físico, choque hipotérmico. Os animais permaneceram até que não foi possível perceber movimentos operculares (WILSON; BUNTE; CARTY, 2009).

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos neste trabalho e no referencial bibliográfico, se pode concluir que:

a) Quanto à espécie *Salix humboldtiana* e a análise farmacognóstica do EBSH:

- Constatou-se que as análises qualitativas e quantitativas de autenticidade e pureza do pó obtido de folhas do *S. humboldtiana*, estão em acordo com os parâmetros de qualidade preconizados pela Farmacopeia Brasileira 6ª ed.;
- Os procedimentos de colheita e pós-colheita foram adequados e garantem boa conservação e secagem da matéria-prima vegetal, já que a droga vegetal apresentou teor de perda por dessecação dentro dos parâmetros de qualidade.

b) Quanto à análise fitoquímica:

- A triagem fitoquímica possibilitou a determinação de metabólitos secundários responsáveis pelas diversas atividades atribuídas à espécie *S. humboldtiana*. Reportada na literatura. Observou-se a presença: fenóis, taninos, flavonoides;
- O EBSH e suas frações sugerem a presença de compostos pertencentes à classe de flavonoides quando analisados por: CCD e CLAE-DAD;
- Análise por CCD, indicou a presença de análogo rutina em *S. humboldtiana*;
- Análise por CLAE permitiu caracterizar a presença de análogo rutina no EBSH;
- As classes de substâncias majoritárias foram os compostos fenólicos, estando de acordo com o perfil químico da espécie (*S. humboldtiana*).

c) Quanto ao ensaio biológico em modelo zebrafish (*D. rerio*) e tratamento com EBSH para avaliação da atividade antiinflamatória e inibição do edema:

- A exposição de *D. rerio* a concentrações de 75, 150, 300, 500 e 750 mg/mL do EBSH durante 5 horas permitiu concluir quanto aos parâmetros comportamentais que as três menores concentrações provocaram alterações brandas no comportamento, enquanto as duas maiores concentrações ocasionaram alterações severas;
- Entre as cinco diferentes concentrações do EBSH testados e avaliados no modelo zebrafish, a concentração de 500 mg fornece resposta estatisticamente mais expressiva quanto à atividade anti-inflamatória após 5 h de tratamento. Essa resposta foi superior ao padrão indometacina se comparados ao controle negativo, indicando dessa forma a capacidade de redução e/ou inibição do edema na região peritoneal.

REFERÊNCIAS

- ABREU, I.N.; AHNLUND, M.; MORITZ, T.; ALBRECHTSEN, B.R. UHPLC-ESI/TOFMS **Determination of salicylate-like phenolic glycosides in *Populus tremula* leaves.** J. Chem. Ecol. 2011.
- AGNOLET, S.; WIESE, S.; VERPOORTE, R.; STAERK, D. **Comprehensive analysis of commercial willow bark extracts by new technology platform: Combined use of metabolomics, HPLC chromatography–solid-phase extraction–nuclear magnetic resonance spectroscopy and high-resolution radical scavenging assay.** J. Chromatogr. 2012.
- AGUIAR, T. M. **Caracterização química e física de folhas, frutos e sementes do bajúru (*Chrysobalanus icaco*, L.) e avaliação do chá dessas folhas em camundongos (swiss) normais e diabéticos.** Dissertação - UFRRJ, 2010.
- ALTMANN, J. **Observational study of behavior: sampling methods.** 1974.
- ALVES, L.F. **Laboratório Flora Medicinal: marco no estudo das plantas medicinais brasileiras.** Revista Fitos. Rio de Janeiro, 2013.
- AMARANTE, C. B. **Estudo químico, farmacognóstico, atividade biológica e farmacológica de *Montrichardia linifera* (Arruda) (Doutorado) - UFPA, Belém, 2010.**
- ANASTAS, P.T; WARNER, J.C.G. **Chemistry: Theory and Practice.** Oxford University. 2000.
- ANGELO, P.M.; JORGE, N. **Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão.** Revista Instituto Adolfo Lutz (Impr.), São Paulo. v. 66, n. 1, 2007.
- ARGUS, G.W. **Guide to *Salix* (Willow) in the Canadian Maritime Provinces (New Brunswick, Nova Scotia, and Prince Edward Island).** Canadian Museum of Nature, Ottawa, Ontario, Canada. 2007.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS — ABNT ISO 33101:2000.
- AYRES, M.; AYRES, M. J.; AYRES, D. M; DOS SANTOS, A. S. In: **Bioestat 5.0: aplicações estatísticas nas áreas das ciências biológicas e médicas.** Ed. Sociedade Civil Mamirauá, Belém Pará, 2007.
- BADKE, M.R.; BUDÓ, M.L.D.; ALVIM, N.A.T.; ZANETT, G.D.; HEISLER, E.V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, SC v. 21, n. 02, p. 363-370, Abr-Jun 2012.
- BATISTA, E.K.F; TRINDADE, H.I; LIRA, S.R.S; MULLER, J.B.B.S; SILVA, L.L.B; BATISTA, M.C.S. **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*.** Rev. Bras. Pl. Med., SP. v.18, n.2, p.433-441, 2016.

BANDEIRA, K. F. **Otimização e comparação de metodologias de extração de caseínas em *Casearia sylvestris***. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Química, Araraquara, 2004.

BARBAZUK, W.B., KORF, I., KADAVI, C., HEYEN, J., TATE, S., WUN, E., BEDELL, J.A., MCPHERSON, J.D., JOHNSON, S.L. **The syntenic relationship of the zebrafish and human genomes**. *Genome Res.* 2000.

BARBOSA, W. L. R. SANTA BRIGIDA A., REMÍGIO, M.S.N. **ALFAFITO: Alfarrabios de Fitoquímica**. 1ª edição. Curitiba, 2020.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J. D. **Herbal medicine**. 3ed, Londres: Pharmaceutical Press, 2001.

BEECHER, G.R. (2003). Overview of Dietary Flavonoids: Nomenclature, Occurrence and Intake. **The Journal of Nutrition**, v. 133, n. 10, 2003.

BERGER, M.E. **Plantas Medicinais da Amazônia**, 2ª ed. Brasil: CNPq, 1992, 207 p.

BITTENCOURT, T.Q.M. et al. **Efeitos tóxicos de compostos de vanádio sobre os parâmetros biológicos de embriões, e adultos de zebrafish (*Danio rerio*)**. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, Belo Horizonte , v. 70, n. 6, p. 1877-1886, Dec. 2018.

BORELLA, J.C. et al. **Variabilidade sazonal do teor de saponinas de *Baccharis trimera* (Less.) isolamento de flavona**. *Rev Bras Farmacogn*, vol.16, nº4. 2006.

BORGES, R.S; LIMA, E.S; KEITA, H; FERREIRA, I.M; FERNANDES, C.P; CRUZ R.A.S; DUARTE, J.L; VELÁZQUEZ-MOYADO, J; ORTIZ, B.L.S; CASTRO, N.A; FERREIRA, J.V; HAGE-MELIM, L.I.S. **Anti-inflammatory and antialgic actions of a nanoemulsion of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and a molecular docking study of its major chemical constituents**. *Inflammopharmacology*. 2017.

BOURDY, G.; CHAVEZ-DE-MICHEL, L. R.; ROCA-COULTHARD, A. Pharmacopoeia in a shamanistic society: the Izoceño-Guaraní (Bolivian Chaco). **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 91, p. 189-208, 2004.

BOVINO, E. E. **Toxicidade aguda do fipronil em peixes danio rerio (zebrafish)**. 2016. 57p. Tese (Doutorado) – Universidade Paulista, São Paulo, 2016.

BRAGA, T. V.; OLIVEIRA, OLIVEIRA, T. T.; PINTO, J. T.; DORES, R. G. R.; NAGGEM, T. J. **Determinação de massa fresca, massa seca, água e cinzas totais de folhas de *Cissus verticillata* (L.) e avaliação do processo de secagem em estufa com ventilação forçada**. *Rev. Ciênc. Farm. Bás.*, v. 28, n. 3, p. 287-90, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Atenção Básica. Gerência Técnica de Assistência Farmacêutica. Grupo de Estudos de Fitoterápicos. **Relação das plantas medicinais de uso tradicional no SUS**. Brasília, 2001.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução de colegiado nº 2016 de 15 de setembro**, Brasília, 2004.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares**, Brasília, 2006a.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, Brasília, 2006b.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 26, 2014 - Dispõe sobre o Registro de Medicamentos Fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos**. Brasília, 2014.

_____. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira. 6ª ed. Volume II** – Monografias. Brasília, 2019a.

_____. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC Nº 298, De 12 de agosto de 2019, DOU Nº 156, 14 de agosto de 2019 - Dispõe sobre a aprovação da Farmacopeia Brasileira, 6ª edição**. Brasília, 2019b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Formulário Terapêutico Nacional: **Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do SUS RENISUS**. Acesso em outubro de 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RDC nº 463, de 27 de janeiro de 2021**. Que dispõe sobre a aprovação da 2ª edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira.

BRITO, K. S.. **Investigação comportamental e molecular em zebrafish (*Danio rerio*) exposto a dose subconvulsivante de Pentilenotetrazol (PTZ) com objetivo de indução ao modelo de Kindling**. – Campinas, SP: [s.n.], 2018.

BRUCE, P.Y. **Organic Chemistry**. 5ª ed. 2007.

BRUNDO, M. V., SALVAGGIO, A. **Zebrafish or *Danio rerio*: A New Model in Nanotoxicology Study**. 2018.

BRODY, D. E.; BRODY, A. R. **As Sete Maiores Descobertas Científicas da História**, Parte 2, Cia das Letras, São Paulo, 2000.

CALLEGARI-JACQUES, S.M. **Bioestatística: Princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2003.

CARPANEZZI, A. A.; TAVARES, F. R.; SOUZA, V. A. **Informações sobre a estaquia do salseiro (*Salix humboldtiana* Willd.)**. Circular Téc. Colombo, v. 33, p. 1-15, 1999.

CARVALHO, A.C.B. et al. Situação de registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, abr-jun. 2006.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos Anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmed, 2004.

CARVALHO, J.C.T.; KEITA, H; SANTANA, G.R; SOUZA, G.C; SANTOS, I.V.F; AMADO, J.R.R; KOUROUMA, A; PRADA, A.L; CARVALHO, H.O; SILVA, M.L. **Effects**

of **Bothrops alternatus** venom in zebrafish: a histopathological study. **Inflammopharmacol.** 2017.

CASTEJON, F. V. **Taninos e saponinas.** Seminários aplicados, Goiânia 2011.

CECCHI, H. M. **Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos.** 2. ed. Campinas- SP: Editora da UNICAMP, 2003.

CHAULET, V. R. L. **Avaliação neurocomportamental de Danio rerio (ZEBRAFISH) intoxicados por arseniato e o uso de medicamentos ultra-diluídos na reversão do quadro.** São Paulo, 2018.

CHEN, J.-H.; SUN, H.; YANG, Y.-P. Comparative morphology of leaf epidermis of *Salix* (Salicaceae) with special emphasis on sections *Lindleyanae* and *Retusae*. **Botanical Journal of the Linnean Society.** Oxford, Londres, v. 157, p. 311-322, 2008.

CHICOUREL, E.L. et al. **Contribuição ao conhecimento analítico de três compostas medicinais.** *Rev Bras Farmacogn*, 7/8: 59-66, 1998.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. (Org.). **Fundamentos de cromatografia.** Campinas, SP: UNICAMP, 2006.

COLLYMORE, C., RASMUSSEN, S., TOLWANI, RJ. **Gavaging Adult Zebrafish.** *J. Vis. Exp.* (78), e50691, doi: 10.3791 / 50691. 2013.

COSTA, R.S; OZELA, E. F; BARBOSA, W.L.R; PEREIRA, N.L; JUNIOR, J.O.C.S. **Caracterização física, química e físicoquímica do extrato seco por nebulização (spray-drying) de *Cynara scolymus* L.** *Rev. Bras. Farmácia* 90(3): 169-174, 2009.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 5. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 2, 1994.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 3. ed. v. III. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian. 2001.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional.** 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.

COUTO, S. **Classificação dos animais de laboratório quanto ao status sanitário.** In: Andrade A, Pinto SC, Oliveira RS editores. *Animais de Laboratório - criação e experimentação.* Rio de Janeiro: Editora Fiocruz; 2002.

CUNHA et al. **Farmacognosia e Fitoquímica.** Ed. Fund. Calouste Gulbenkian, 2005.

DAMMSKI, ANA PAULA; MÜLLER, BRUNO ROBERTO; GAYA, CAROLINA; REGONATO, DAIANE. **Zebrafish Manual de Criação em Biotério.** 1ª Edição. Universidade Federal do Paraná (UFPR) - Curitiba, 2011.

DANG, M; HENDERSON, R.E; GARRAWAY, L.A; ZON, L.I. Long-term drug administration in the adult zebrafish using oral gavage for cancer preclinical studies Published by The Company of Biologists Ltd | *Disease Models & Mechanisms.* 2016.

DAVIS, D. J. et al. *Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish. *Sci Rep*, v. 6, 2016.

DEHARO, E.; BOURDY, G.; QUENEVO, C.; MUÑOZ, V.; RUIZ, G.; SAUVAIN, M. **A search for natural bioactive compounds in Bolivia through a multidisciplinary approach. Part V. Evaluation of the antimalarial activity of plants used by the Tacana Indians.** *J. Ethnopharmacol.*, Limerick, v. 77, p. 91-98, 2001.

DI ROSA, M. **Pharmacological properties of carrageenan.** *J. Pharm.*, V. 24, 1972.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P; WILLOUGHBY, D.A. **Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in diferente sites by carrageenn and turpentine.** *J. Pathology*, V. 104, p. 15-29, 1971.

DI STASI, L. C. (Org). **Plantas medicinais: arte e ciência, um guia para uma pesquisa interdisciplinar.** São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996.

DORNAS, W.C.; OLIVEIRA, T.T.; RODRIGUES-DAS-DORES, R.G.; SANTOS, A.F.; NAGEM, T.J. **Flavonoides: potencial terapêutico no estresse oxidativo.** *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, v.28, n.3, p. 241-249, 2007.

EINBOND, L.S.; REYNERTSON, K.A.; LUO, X.D.; BASILE, M.J.; KENNELLY, E.J. **Anthocyanin antioxidants from edible fruits.** *Food chemistry*, v.84, p.23-28, 2004.

ELISABETSKY, E. *Etnofarmacologia. Ciência e Cultura*, vol. 55, nº 3, p. 35-36, 2003.

ELISABETSKY, E., "Etnofarmacologia como Ferramenta na Busca de Substâncias Ativas" in "Farmacognosia: da Planta ao Medicamento". 1999.

EMA, European Medicines Agency. European Union herbal monograph on *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt, rhizoma. London: Committee on Herbal Medicinal Products. 2010.

EMBRAPA. Circular técnica – 147. Extraído de: **Espécies arbóreas brasileiras.** Brasília, DF. v.1. 2003. Colombo, PR. 2008.

ENGESZER R. E. et al. **Zebrafish in the Wild: A Review of Natural History and New Notes from the Field. ZEBRAFISH - Volume 4, Number 1, 2007.**

ESCALEIRA, R. C. **O Zebrafish (Danio rerio): contribuições para a pesquisa biomédica na Marinha do Brasil.** *ARQ. BRAS. MED. NAVAL*, RIO DE JANEIRO, V. 78 N.1 JAN/DEZ. 2017.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. **Introdução à análise fitoquímica.** *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 5ed. RS, 2003.

FARIAS, N. O. **Avaliação dos efeitos ecotoxicológicos e comportamentais do fármaco psicotrópico fluoxetina usando o peixe-zebra (Danio rerio) como espécie modelo.** Brasília, 2018.

FERNANDES, CARROMBERTH CARIOCA et al. **Salicilatos isolados de folhas e talos de *Salix martiana* LEYB. (Salicaceae)**. Química Nova, SP. v. 32, n. 4, 2009.

FERREIRA, L. M. FERREIRA, L. R. K. **Experimental model: historical and conceptual revision**. SP, v. 18, n. spe, p. 01-03, 2003.

FISHMAN MARK C. **Zebrafish - the canonical vertebrate**. Science. 2001.

FILHO, L. D. **Fundamentos epistemológicos da geografia**. 1. ed. Curitiba: IBPEX, 2009 (Metodologia do Ensino de História e Geografia, 6), p. 28. 2009.

Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 23 Ago. 2018.

FONSECA, F. N. **Técnicas modernas de separação e análise de extratos vegetais**. Tese - Instituto de Química, USP, São Paulo, 2002.

FRANCO, B.D.G.M; LANDGRAF, M. **Microbiologia de alimentos**. SP, 1996.

FREISCHMIDT, A.; JÜRGENLIEMK, G.; KRAUS, B.; OKPANYI, S. N.; MÜLLER, J. Contribution of flavonoids and catechol to the reduction expression in endothelial cells by a standardised Willow bark extract. **Phytomedicine**, 19, 245–252, 2012.

GAUTAM, R.; SAKLANI, A.; JACHAK, S. M. Indian medicinal plant as a source of antimycobacterial agents. **J. Ethnopharmacol.**, Limerick, v. 110, p. 200-234, 2007.

GEBHARDT. R; **Planta Med.** 2000.

GHAHREMANINEJAD, F.; KHALILI, Z.; MAASSOUMI, A. A.; MIRZAIENODOUSHAN, H.; RIAHI, M. **Leaf epidermal features of *Salix* species (Salicaceae) and their systematic significance**. Am. J. Bot., St. Louis, v. 99, n. 4, 2012.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários**. Quim. Nova, Vol. 30, No. 2, 374-381, 2007.

GOLDSMITH P. **Zebrafish as a pharmacological tool: the how, why and when**. Current Opinion in Pharmacology, V.4, p.504-512, 2004.

GONZÁLEZ-ALAMILLA, E.; RIVAS-JACOBO, M.; SOSA-GUTIÉRREZ, C.; DELGADILLO-RUIZ, L.; VALLADARES-CARRANZA, B.; ROSENFELD-MIRANDA, C.; ZARAGOZA-BASTIDA, A.; RIVERO-PÉREZ, N. **Efeito antibacteriano do extrato metanólico de *Salix babylonica* em bactérias de importância na saúde pública**. Abanico Veterinario, vol. 10 nº 1. Janeiro-Dezembro, 2020.

GOMES et al. – **Utilização do Salgueiro como espécie fitorremediadora em rejeitos da indústria de Zinco**. 2011.

GRUNWALD, D. J; EISEN J. S. **Head-waters of the zebrafish – emergence of a new model vertebrate**. Nature Reviews Genetics. v.3, p.717-24, 2002.

HARBORNE, J.B. **Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis.** Londres. Chapman and Hall. 288p. 1984.

HILL, A., TERAOKA, H., HEIDEMAN, W., PETERSON, R. **Zebrafish as a model vertebrate for Investigating Chemical Toxicity.** Toxicological Sciences. 2005.

HOWE K., CLARK M.D., TORROJA C.F., TORRANCE J., BERTHELOT C., MUFFATO M, et al. **The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome.** Nature. 2013.

HOSTETTMANN, H. K.; QUEIROZ, E.F.; VIEIRA, P.C. **Princípios ativos de plantas superiores.** 2.ed. São Carlos: UFSCar, 2003.

HOSTETTMANN, K. HOSTETTMANN, M. **Xanthonas In: Methods in plant Biochemistry.** Vol. 1. Academic Press. p. 493-508.1989.

HUANG, S.Y.; FENG, C.W.; HUNG, H.C.; CHAKRABORTY, C.; CHEN, C.H.; CHEN, W.F.; JEAN, Y.H.; WANG. H.M.D.; SUNG, C.S.; SUN, Y.M.; WU, C.Y.; LIU, W.; HSIAO, C.D.; WEN, Z.H. **A novel zebrafish model to provide mechanistic insights into the inflammatory events in carrageenan-induced abdominal edema.** PloS one, v. 9, n. 8, p. e104414, jan. 2014.

ISEBRANDS, J.G. e RICHARDSON, J. **Poplars and Willows: trees for society and the environment.** Food and Agriculture Organization of the (FAO), London, 2014.

IUPAC.<<https://www.iupac.org/goldbook/G02661.PDF>>acesso15/04/2019.

JOLY, A.B. Botânica. **Introdução à taxonomia vegetal.** 12. ed. SP: Nacional, 1998.

JUNIOR, A. R. O. **Estudo da interação do extrato de *Salix Alba* (Salgueiro-branco) na marcação de hemácias e proteínas plasmáticas com o tecnécio-99M e na biodistribuição em ratos wistar.** (Mestrado) UFPE, Recife – 2003.

KALUEFF, A.V.; GEBHARDT, M.; STEWART, A.M. et al. **Towards a comprehensive catalog of zebrafish behavior 1.0 and beyond.** Zebrafish, v.10, p.70-86, 2013.

KIMMEL, C. B., BALLARD, W. W., KIMMEL, S. R. **Stages of Embryonic Development of the Zebrafish.** 1995.

KINKEL, MARY D.; EAMES, STEFANI C.; PHILIPSON, LOUIS H.; PRINCE, VICTORIA E. **Intraperitoneal Injection in Adult Zebrafish.** Department of Organismal Biology and Anatomy, The University of Chicago, 2010.

KNIE, J. L. W.; LOPES, E. W. B. **Testes ecotoxicológicos: métodos, técnicas e aplicações.** Florianópolis: FATMA/GTZ, p.289, 2004.

KUMAR, Vinay; ABBAS, Abul K.; ASTER, Jon C. **Robbins patologia básica.** 9. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

KUMARI, A.; UPADHYAY, N.K.; KHOSLA, P.K. **Gender specific variation of two phenolic glycosides (Populin and Salicin) in *Populus ciliata* and identification of a new compound.** International Journal of Pharmacy. Vol 8, issue 12, 2016.

KUPPUSAMY, U.R.; KHOO, H.E.; DAS, N.P. **Structure-activity studies of flavonoids as inhibitors of hyaluronidase.** Biochem Pharmacol 40: 397–401, 2009.

LACHMAN, L.; LIEBERMAN, H. A.; KANIG, J. L. **Teoria e Prática na Indústria Farmacêutica.** Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais.** Ed. Lagoa, Florianópolis: 2003.

LAKHANPAL, P.; RAI, D.K. **Quercetin: A Versatile Flavonoid.** Internet Journal of Medical Update, v. 2, n. 2, p. 1-16. 2007.

LAROZE, L.; SOTO, C.; ZÚÑIGA, M. **Phenolic antioxidants extraction from raspberry wastes assisted by-enzymes.** Electronic Journal of Biotechnology, 2010.

LAWRENCE C. **The husbandry of zebrafish (*Danio rerio*): A review.** ELSEVIER ScienceDirect – Aquaculture. 2007.

LAWRENCE C; HARPER C. **The laboratory zebrafish.** 1st edition. Florida: CRC Press, December 17, 2010.

LAWRENCE, T; FONG, C. **The resolution of inflammation: anti-inflammatory roles for NF- κ B.** International Journal Biochemistry Cell Biology, v. 42, p. 519–523, 2010.

LIESCHKE, G.J., CURRIE, P.D. **Animal models of human disease: zebrafish swim into view.** Nat. Rev. Genet. 8, 353-367. 2007.

LIN, S.; ZHAO, Y.; NEL, A. E.; LIN, S. **Zebrafish: an in vivo model for nano EHS studies.** Small, v. 9, n. 9-10, p. 1608-1618, 2013.

LONGHINI, R.; RAKSA, S. M.; OLIVEIRA, A. C. P.; SVIDZINSKI, T. I. E.; FRANCO, S. L. **Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 17, n. 3, 2007.

LORAM LC, FULLER A, FICK LG, et al. **Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw.** J Pain. 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil.** São Paulo: Nova Odessa, v. 1, 386 p. 2002.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**, 5ª edição. Nova Odessa - SP: Instituto Plantarum, 2008.
MAGALHÃES, M.A.F.; CORTINES, E.; MELO, A.L.; e VALCARCEL, R. **Influência da sazonalidade nos processos de regeneração espontânea na serra Madureira-**

Mendanha, R.J. In: VI Simpósio Nacional sobre Áreas Degradadas, e II Congresso Latino Americano de Recuperação de Áreas. Resumo expandido. 2005.

MAGALHÃES, F.E.A, DE SOUSA, C.A.P.B, SANTOS, S.A.A.R, MENEZES, R.B., BATISTA, F.L.A., ABEU, A.O.; DE OLIVEIRA, M.V.; MOURA, L.F.W.G.; RAPOSO, R.S.; CAMPOS, A.R. **Adult zebrafish (*Danio rerio*): an alternative behavioral model of formalin-induced nociception.** 2017.

MAGNO, L.D.D; FONTES, A.; GONÇALVES, B.M.N. GOUVEIA, A. **Pharmacological study of the light/dark preference teste in zebrafish: waterborne administration.** Pharmacol biochem. Behave. 135, 169-176. 2015.

MAHDI, J.G.; MAHDI, A.J.; BOWEN, I.D. **The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential.** Cell Prolif. 39: 147-155, 2006.

MANACH, C. et al. **Polyphenols: food sources and bioavailability.** Am. J. Clin. Nutr. v. 79, p. 727-747, 2004.

MARCHAND, L.L. **Cancer preventive effects of flavonoides – a review.** Biomed Pharmacother 2002.

MARQUETE, R.; TORRES, R.B., MEDEIROS. **Salicaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2015.

MARTINS, A.B; SACRAMENTO LVS. **Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada.** 16^o Congresso de Iniciação Científica UNESP. Ilha Solteira, Brasil. 2004.

MATTHEWS, M.; VARGA, Z. M. **Anesthesia and euthanasia in zebrafish.** ILAR Journal, Washington, v. 53, n. 2, p. 192-204, 2012.

MATSUKI, M. **Regulation of plant phenolic synthesis: from biochemistry to ecology and evolution.** *Aust. J. Bot.*, 44(6): 613-634. 1996.

MAZINE, F.F.; SOUZA, V.C; RODRIGUES, R.R. **Salicaceae.** In M.G.L. Wanderley, G.J. Shepherd & A.M. Giulietti (coords.). Flora Fanerogâmica do Estado de São Paulo. São Paulo: Fapesp & Hucitec. vol. 2, p. 309-310. 2002.

MCGONNELL, I.M.; FOWKES, R.C. **Fishing for gene function endocrine modelling in the zebrafish.** J. Endocrinol. 2006.

MEDZHITOV, R. **Origin and physiological roles of inflammation.** Nature, v. 454, n. 7203, p. 428–35, 24 jul. 2008.

MELO, C.M.T.; COSTA, L.A.; BONNAS, D.S.; CHANG, R. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de pimentas *Capsicum chinense* (bode), *Capsicum baccatum* variedade *praetermissum* (cumari) e *Capsicum frutescens* (malagueta).** Enciclopédia Biosfera, v. 7, n. 12, p. 1-6, 2011.

MENDEZ, J.; BILIA, A.R.; MORELLI, I. **Phytochemical investigations of Licania genus. Flavonoids and triterpenoids from Licania pittieri.** *Pharma Acta Helv*, 1995.

MICHEL, C.C.; CURRY, F.E. **Microvascular permeability**, *Physiological Reviews*. V. 79, n. 3, p. 703-761, 1999.

MONIGATTI, M.; BUSSMANN, R. W.; WECKERLE, C. S. **Medicinal plant use in two Andean communities located at different altitudes in the Bolívar Province, Peru.** *J. Ethnopharmacol.*, Limerick, v. 145, p. 450-464, 2013.

MONTANHEIRO, M. N. S. **Determinação da densidade de sólidos e líquidos pelo princípio de Arquimede** *Caderno Catarinense de Ensino de Física*, v. 7, 1990.

MOSADDIK, M. A.; BANBURY, L.; FORSTER, P.; BOOTH, R.; MARKHAM, J.; LEACH, D.; WATERMAN, P. G. Screening of some Australian Flacourtiaceae species for in vitro antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytomedicine**, 2004.

MOURA, V. P. G. **Introdução de Novas Espécies de Salix (Salicácea) no Planalto Sul de Santa Catarina, Brasil.** 1. ed. DF: Embrapa (comunicado técnico, 71) 2002.

MOURA FILHO, J.M; NAGAI, L.Y; NASCIMENTO, L.C.S; NETO, A.A.C; PENNA, A.L.B. **Determinação do solvente ótimo para extração dos compostos fenólicos do fruto de buriti.** *Brazilian Journal of Research*, V. 8 n. 3. P. 22-28. Jul/set. 2017.

NAHRSTEDT, A.; SCHMIDT, M.; JÄGGI, R.; METZ, J.; KHAYYAL, M. **Willow bark extract: the contribution of polyphenols to the overall effect**, 2007.

NAVARRO, F. F. **Cissus gongylodes: caracterização farmacognóstica e investigação de aspectos preliminares da seguridade da utilização de extratos aquosos das folhas e caules.** 2009. 70 f. (Dissertação) SP, Araraquara, 2009.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural Products as Sources of New Drugs over the period 1981-2002.** *J Nat Prod*, v. 66, p. 1022-1037, 2003.

NORONHA, A.M.B; ITO, N.M.K. **Efeito do metotrexato na resposta de edema induzido pela injeção podal de carragenina.** USP. 1990.

NUNES, B. S. et al. **Lectin extracted from Canavalia grandiflora seeds presents potential antiinflammatory and analgesic effects.** *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, v. 379, n. 6, p. 609–616, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica.** 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997.

OLIVEIRA, A. B.; et al. **Plant derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines.** *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 81, 2009.

PARNG C. SENG W.L, SEMINO C, MCGRATH P. **Zebrafish: a Preclinical model for drug screening.** *Assay Drug Dev Technol*, 2002.

PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K., **Flavonoids as medicinal agents: recent advances.** *Fitoterapia*, Amsterdam, v. 57, n. 5, p. 371-389, 1991.

PAVIA, D.L.; LAMPMAN, G.M.; KRIZ, G.S. **Introduction to Spectroscopy: A Guide for Students of Organic Chemistry.** 2. ed. Harcourt Brace College Publishers, 1996.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** Dissertação (Mestrado). USP, São Paulo, 2005.

PENNA, S.C. et al., **Antiinflammatory effect of the hydroalcoholic extract of zingiber officinale rhizomes on rat paw and skin edema.** *Phytomedicine*, v. 10, 2003.

PEREIRA, R. J; CARDOSO, M. G. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** *Journal of Biotechnology and Biodiversity*. Vol. 3, N.4. 2012.

PINELO, M., RUBILAR, M., JEREZ, M., SINEIRO, J., NUNEZ, M.J., **Effect of solvent, temperature, and solvent-to-solid ratio on the total phenolic content and antiradical activity of extracts from different components of grape pomace.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53 (6), 2004.

PINTO, A. C. et al. **Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectiva.** *Química Nova*, São Paulo, v. 25, Supl. 1, p. 45-61, maio 2002.

POHJAMO, S. P.; HEMMING, J. E.; WILLFÖR, S. M.; REUNANEN, M. H. T.; HOLMBOM, B. R. **Phenolic extractives in *Salix caprea* wood and knots.** *Phytochemistry*, p. 165-169, 2003.

POMBEIRO, A.J.L.O. **Técnicas e operações unitárias em química laboratorial.** 4.ed. Ed. Fundação Calouste Gulbenkian. 2003.

PORTO, H. S. M. **HPLC versus UPLC: avaliação de aspectos críticos à transferência e validação de métodos analíticos.** 2014.

PRINCE V.E., ANDERSON R.M., DALGIN G. **Zebrafish Pancreas Development and Regeneration: Fishing for Diabetes Therapies.** *Current Topics in Developmental Biology*. IN PRESS. 2016.

PUGACH, E. K.; LI, P.; WHITE, R.; ZON, L. **Retro-orbital injection in adult zebrafish.** *J. Vis. Exp.*34, 2009.

QIN, F; SUN, H.X. **Immunosuppressive activity of Pollen Typhae ethanol extract on the immune responses in mice.** *J. Ethnopharmacol.* 102: 424-429, 2005.

RABBANI M, SAJJADI SE, RAHIMI F. **Anxiolytic effect of flowers of *Salix aegyptiaca* L. in mouse model of anxiety.** *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, v. 7, n. 1, p. 18-22, 2010.

RAKESH, S.S; MONALI, L.P; DHEERAJ, H.N; SANJAY, U.N; SOHAN, S.C. **Development and Validation of HPLC Analytical Protocol for Quantification of Salicin from Salix alba L.** Inventi Rapid: Pharm Analysis & Quality Assurance, 2015.

RAMBO, M. K. D.; RAMBO, M. C. D.; ALMEIDA, K. J. C. R.; ALEXANDRE, G. P.; **Estudo de análise termogravimétrica de diferentes biomassas lignocelulósicas utilizando a análise por componentes principais.** Ciência e Natura. v. 34, 2015.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. (Trad. Do Nascimento, A. P.); **Farmacologia**, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2007.

RAWEL, H.M. CZAJKA, D.; ROHN, S.; KROLL, J. **Interactions of different phenolic acids and flavonoids with soy proteins.** International Journal of Biological Macromolecules, v. 30, p. 130-150. 2002.

RÉGIS, B.; PAIVA, R. MARTINOTTO, C. CRAVO, R. DUARTE, P. **Indução de calos friáveis em explantes foliares de Salix (*Salix humboldtiana*).** Ciência Rural 2005.

REITZ, R.; KLEIN, R.M.; REIS, A. **Projeto madeira do Rio Grande do Sul.** Sellowia, Itajaí, n.34/35, p.1-525, 1983.

RENSHAW, S.A; TRADE, N.S. **A model 450 million years in the making: zebrafish and vertebrate immunity.** Disease Models Mechanisms, v. 5, n. 1, jan. 2012.

REVILLA, J. **Cultivando a saúde em hortas caseiras e medicinais.** Manaus: INPA, 2001.

RESENDE, R.R; SOCCOL, C.R. **Biotechnologia aplicada à saúde: fundamentos e aplicações**, volume 1. São Paulo: Blucher, 2015.

RIBEIRO. R. L. V. **Uso do etanol como modificador orgânico de fase móvel para cromatografia líquida de alta eficiência.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Química. 1999.

RIBEIRO, L. C. **Investigação do efeito icotóxico do extrato etanólico da raiz de *Spilanthes acmella* (jambu) em zebrafish através da análise eletrofisiológica e comportamental.** 61 f. Dissertação - UFPA. 2013.

RIBÉREAU-GAYON, P. **Les Composés Phénoliques des Végétaux.** Paris, 1968.

ROBBERS, J. E. Speedie, Marylin K. Tyler, Varro E. **Farmacognosia e Biotechnologia.** Editora Premier. 1997.

ROCKENBACH, I.I; SILVA, G. L; RODRIGUES, E; KUSKOSKI, E. M; FETT, R. **Influência do solvente no conteúdo total de polifenóis, antocianinas e atividade antioxidante de extratos de bagaço de uva (*Vitis vinifera*) variedades Tannat e Ancelota.** Ciênc. Tecnol. Aliment. Campinas, 28(Supl.): 238-244, dez. 2008.

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. **Plantas medicinais no contexto de políticas públicas.** Informe Agropecuário, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p. 7-12, mar/abr. 2010.

RODRIGUES, F. A. et al. **Obtenção de extratos de plantas do cerrado**. Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 13, n. 23, p.870-887, 2016.

ROHNERT, U.; SCHNEIDER, W.; ELSTNER, E.F. **Superoxide-dependent and -independent nitrite formation from hydroxylamine: inhibition by plant extracts**. *J. Biosci.* 53: 241–249, 1998.

ROMARIZ, D, A. **Humboldt e a fitogeografia**. São Paulo: Lemos Editorial, 1996

ROSEMBERG, D. B. et al. **Differences in Spatio-Temporal Behavior of Zebrafish in the Open Tank Paradigm after a Short-Period Confinement into Dark and Bright Environments**. *Plos One*, v. 6, n. 5, maio, 2011.

ROSSI, J. A. J.; SINGLETON, V. L. **Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents**. *American Journal of Enology and Viticulture*, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SALVADOR, M.; HENRIQUES, J.A.P. **Radicais livres e a resposta ao estresse oxidativo**. Ed. ULBRA, 2004.

SALVEMINI D, WANG ZQ, WYATT PS, et al. **Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation**, 1996.

SALES M.D.C; SARTOR, E.B; GENTILLI, R.M.L. **Etnobotânica e etnofarmacologia: medicina tradicional e bioprospecção de fitoterápicos**. *Salus J Health SCi.* 2015.

SAMPAIO, T. I. S.. **Validação farmacológica e toxicológica em *Danio rerio* do extrato hidroetanólico das folhas de *Spondias mombin*: atividades ansiolítica, antidepressiva e toxicidade**. Macapá, 2018.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; SOARES, F. P.; NOGUEIRA, R. C.; EMRICH, E. B.; SILVA, D. P. C. **Aspectos fitoquímicos de tecidos foliares de *Salix***, 2008.

SANTOS, IGOR VICTOR FERREIRA DOS. **Estudo da toxicidade da fitopreparação popular a base de leite de janaguba em modelo de Zebrafish**. Unifap. 2016.

SASZIK, S. M.; SMITH, C. M. **The impact of stress on social behavior in adult zebrafish (*Danio rerio*)**. *Behavioural pharmacology*, v. 29, n. 1, p. 53-59, 2018.

SCARPA, G. F. Medicinal plants used by the Criollos of Northwestern Argentine Chaco. *J. Ethnopharmacol.* Limerick, v. 91, p. 115-135, 2004.

SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; ATHAYDE, M. L. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3ed. Porto Alegre: 2001.

SCHRECK, C. B.; OLLA, B. L.; DAVIS, M. W. Behavioral responses to stress. **Fish stress and health in aquaculture**, v. 62, p. 145-170, 1997.

SHARA, M.; STOHS, S.J. **Efficacy and Safety of White Willow Bark (*Salix alba*) Extracts**. *Phytother. Res.*, v. 29, p. 1112–1116, 2015

SHARAPIN, N. **Fundamentos de Tecnologia de Produtos Fitoterápicos**. Santafé de Bogotá: Convênio Andrés Belo, 2000.

SHARMA, S.; SAHU, D; DAS, H.R; SHARMA, D. **Amelioration of collagen induced arthritis by Salix nigra bark extract via suppression of proinflammatory cytokines and oxidative stress**. Food Chem Toxicol. 2011.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. **Mechanisms of the inflammatory response**. *Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology*, 2004.

SHIN, J. T., FISHMAN, M. C.. **From Zebrafish to Human: Modular Medical Models**. Annual Review of Genomics and Human Genetics. 2002.

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

SILVA, M. J. A. **Atividade anti-inflamatória de novos compostos sintéticos da classe dos nitroestirenos**. Dissertação, UFAM, 2016.

SILVEIRA, T. R. da; SCHNEIDER, A. C.; HAMMES, T. O. **Zebrafish: modelo consagrado para estudos de doenças humanas**. Ciência e Cultura, v. 64, 2012.

SILVERSTEIN, R.M; WEBSTER, F.X. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 6ª ed. Rio de Janeiro: LTC; 2000.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6 ed. 1 reimp. Porto Alegre. Editora da UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2010. cap. 12 e 16. p. 263-403.

SIMÕES, V. **Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon**. Quím. Nova, São Paulo, 2013.

SOARES, L. A. L.; ORTEGA, G. G.; BASSANI, V. L.; PETROVICK, P. R. **Desenvolvimento tecnológico de soluções extrativas aquosas de Phyllanthus niruri empregando planejamento fatorial**. Caderno de Farmácia, 1998.

SOUSA, O.V. *et al.* **Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do óleo essencial de cascas de Duguetia lanceolata St. Hil., Annonaceae**. Rev. bras. farmacogn., Maringá , v. 14, supl. p. 11-14, 2004 .

SOUSA, C. M. M. *et al.* **Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais**. Quim. Nova. v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, R.M.F **Estudo químico de Eugenia calycina cambess e avaliação das atividades antimicrobianas. Antioxidante e inibidora da enzima amylase**. 2015.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática - Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Nova Odessa: Plantarum, 2005.

SOUZA, N. L.; MERUSSE, L. B. **A utilização de animais de laboratório**. In: LUCA, R. R. et al. (Ed.). Manual para técnicos em bioterismo. 2. ed. SP: Winner Graph, 1996.

SOUZA, G.C. **Estudo da toxicidade da nanoemulsão de álcool perílico (NPOH) sobre zebrafish (*Danio rerio* Hamilton, 1822)**. Dissertação. Macapá. 2015.

SOUZA, G.C; DUARTE, J.L; FERNANDES, C.P; MOYADO, J.A.V; NAVARRETE, A; CARVALHO, J.C.T. **Obtainment and Study of the Toxicity of Perillyl Alcohol Nanoemulsion on Zebrafish (*Danio rerio*)**. J Nanomed Res 4. 2016.

SPENCE R, GERLACH G, LAWRENCE C, SMITH C. **The behaviour and ecology of the zebrafish, *Danio rerio***. Biol Rev. 2008.

STAHL, E., SCHILD, W. **Pharmazeutische Biologie. Drogenanalyse II: Inhaltsstoffe und Isolierungen**. Gustav Fischer Verlag, 1981.

STREISINGER, G., WALKER, C., DOWER, N., KNAUBER, D. e SINGER, F., **Production of clones of homozygous diploid zebrafish**. Nature. 1981.

STUELTEN, C. H., PARENT, C. A., MONTELL, D. J. **Cell motility in cancer invasion and metastasis: Insights from simple model organisms**. Nature Reviews, 2018.

SUN, H. X.; XIE, Y.; YE, Y. P. **Advances in saponin-based adjuvants**. Vaccine, v. 27, n. 12, p.1787-1796, 2009.

TECHIO, P. X.; BELO. M. A. A. **Estrutura química e interação molecular farmacodinâmica entre salicilatos e oxicans**. Enciclopédia biosfera, 2012.

TERRAZAS, P. M. **Investigação dos efeitos citotóxicos e genotóxicos do extrato de *Salix alba***: análise in vitro, in vivo e histológicas. Botucatu, 2017.

TROPICOS. Disponível: <<http://www.tropicos.org.br>>. Acesso: 18 de agosto de 2018.

TROWBRIDGE, H. O.; EMLING, R.C. **Inflamação: rev. do proc**. 4ª ed. SP. 1996.

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. **Plantas medicinais: cura segura**. Quím. Nova, SP, v. 28, n. 3, June 2005.

VIEGAS JR, C; BOLZANI, V.S; BARREIRO, E.J. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Quím. Nova, SP, Apr. 2006.

WAGNER, H.; BLAT, S. **Plant Drug Analysis: A thin layer chromatography atlas**. 2. Ed. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. 2001.

WANG, J.; YUE, Y-D.; TANG, F.; SUN.; J. TLC **Screening for antioxidant activity of extracts from fifteen Bamboo Species and identification of antioxidant flavone glycosides from leaves of *Bambusa textilis* McClure**. Molecules. 2012.

WANG, Q.; KUANG, H.; SU, Y.; FENG, J.; RUI, G.; CHAN, K. **Naturally derived anti-inflammatory compounds from chinese medicinal plants.** Journal of Ethnopharmacology, v. 146, n. 1, p. 9–39, 7 mar. 2013.

WESTERFIELD, M. **The Zebrafish Book. A guide for the laboratory use of zebrafish (Danio rerio).** University of Oregon Press. 2000.

WILLIAMSON, E.M. **Synergy and other interactions in phytomedicines. Phytomedicine.** 8: 401–409, 2001.

WILSON, J. M.; BUNTE, R. M.; CARTY, A. J. **Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (Danio rerio).** Journal of the American Assoc. for Lab. Anim. Science, 2009.

WINK, M. **Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogeny perspective.** Phytochemistry, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials.** Geneva: p.3, 1998.

_____. **Tradicional Medicinal Strategy 2014-2023.** Hong Kong: WHO, 2013.

WONGKITTIPONG, R., PRAT, L., DAMRONGLERD, S., GOURDON, C. **Solid–liquid extraction of andrographolide from plants – experimental study, kinetic reaction and model.** Separation and Purification Technology 40 (2), 147–154. 2004.

WURM, G.; BAUMANN, J.; GERE, U. Influencing the arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Dtsch Apotheker Zt** 122: 2062–2068, 1982.

YU, H.G.; HUANG, J.A.; YANG, Y.N.; HUANG, H.; LUO, H.S.; YU, J.P.; MEIER, J.J.; SCHRADER, H.; BASTIAN, A.; SCHMIDT, W.E.; SCHMITZ, F. The effects of acetylsalicylic acid on proliferation, apoptosis, and invasion of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cells. **Eur J Clin Invest.** 32: 838-846, 2002.

YUNES, R.A; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. **Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil.** Química Nova, v.24, p.147- 152, 2001.

ZAITER, A. et al. **Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of different granulometric classes of *Salix alba* (L.) bark powders.** Powder Technology, 2016.

ZHANG, B.; LI, J. B.; ZHANG, D. M.; DING, Y.; DUG. H. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis*. REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, 2007.

ZORZETO, T. Q.; DECHEN, S. C. F.; ABREU, M. F.; FERNANDES JÚNIOR, F. **Caracterização física de substratos para plantas.** Bragantia, v. 73, n. 3, 2014.

ANEXO

Parecer: Aprovado do Comitê de Ética no Uso de Animais – UFPA

UFPA - INSTITUTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO
PARÁ



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO FITOQUÍMICO E FARMACOLÓGICO (ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA) DO EXTRATO AQUOSO E HIDROETÍLICO DAS FOLHAS DE SALIX HUMBOLDTIANA EM MODELO DE ZEBRAFISH (*Danio rerio*)

Pesquisador: Uêbem Fernandes Ramos

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 35524020.5.0000.0018

Instituição Proponente: Faculdade de Farmácia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.210.040

Apresentação do Projeto:

As folhas de *Salix Humboldtiana* Willd, família Salicaceae, são utilizadas na medicina tradicional para o tratamento de diversas doenças inflamatórias, dores de origem reumáticas, estado febril, entre outros injurias. Porém, existem poucas evidências científicas descritas sobre a espécie. O gênero *Salix*, apresenta uma diversidade significativa de usos na medicina popular, tendo na espécie *Salix alba* L. o seu mais consagrado representante. O *Salix alba* L. está incluído no Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (FFFB), sendo descrito o preparo do extrato aquoso das folhas, indicado como anti-inflamatório e antitérmico na forma de preparações extemporâneas. Diante desta promissora possibilidade de inserção desta espécie no FFFB e na falta de estudo químicos do *Salix humboldtiana* Willd. Este trabalho se propõe a realizar investigação de compostos relevantes através de estudos farmacognósticos (físico e físico-químico); abordagem fitoquímica (triagem e prospecção) e utilização de técnicas hifenadas, (PREP-CLAE e CLAE-DAD-MS). Neste sentido, será utilizado o Extrato bruto Hidroetílico (EBHSh), Aquoso (EAqSh) e frações, da espécie, através de análises por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a DAD, bem como suas atividades antiinflamatórias. Dessa forma, faz-se de grande interesse investigar a sua constituição química e suas possíveis atividades biológicas, visto que a comprovação científica promove uma alternativa de tratamento de forma segura aos usuários.

Endereço: Rua Augusto Comães nº 01- Campus do Guamá, UFPA- Faculdade de Enfermagem do IC8 - sala 13 - 2º and.
Bairro: Guamá **CEP:** 66.075-110
UF: PA **Município:** BELEM
Telefone: (91)3201-7735 **Fax:** (91)3201-8028 **E-mail:** cepccs@ufpa.br